

*este trabalho foi
devidamente corrigido
conforme resolução
Piracicaba, 31/8/87
A. M. B. de S.*

CEP 6/036/87

Impl. 15.10.92

WALTER ROCHA

Estudo Morfométrico e Histopatológico dos efeitos da Hipervitaminose A, na Glândula de Harder de Ratos, durante a Lactação.

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP, para obtenção do
grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Farmacologia

PIRACICABA - 1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu pai e à minha mãe, que moldaram o meu
ser e lapidaram o meu caráter.

Acreditar na pessoa amada é um ato de con-
fiança e de coragem. Obrigado, Lila.

Às minhas filhas,
Patrícia e Giovanna,
razões mais fortes de todo
nosso empenho,
fontes puras da
nossa recompensa.

DEDICO ESTE TRABALHO.

Ao Professor Doutor JOSÉ RENAN VIEIRA
DA COSTA, cientista dedicado, idealista, competente,
amigo sincero e desinteressado, que luta constan
tamente para a elevação do nível científico da
nossa Escola, a quem devo grande parte dos ensinamen
tos contidos neste Trabalho, o nosso agradecimen
to especial, a nossa eterna gratidão.

Ao Professor Dr. AMADO LEONÍSIO DE AZEVEDO,
pela orientação segura, pelo apoio constante, pela ami-
zade e atenção.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. PAULO RENATO COSTA SOUZA, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade a nós conferida para a realização e conclusão do Curso de Pós-Graduação.
- Agradecemos, em especial, à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), através de seu digníssimo Diretor, Dr. SIMONI DES CONSANI.
- Ao Professor Dr. SAMIR TUFIC ARBEX, Coordenador Geral do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo estímulo constante à pesquisa, pelos ensinamentos precisos.
- Ao Professor Dr. ANTÔNIO CARLOS NEDER, pelos ensinamentos recebidos durante o Curso de Pós-Graduação e pela oportunidade a nós conferida.
- Ao Companheiro, Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA), Professor AFRÂNIO CAIAFA DE MESQUITA, pelo incentivo à pesquisa, pela abertura científica e social em nossa Escola, pelo crédito àqueles que fazem do Magistério um ideal.
- Ao Professor VINÍCIUS VIEIRA VIGNOLI, Chefe do Departamento de Morfologia, pelo apoio, compreensão e carinho dedicados a nossa pessoa.
- Ao Professor ANTÔNIO CAMILO DE SOUZA CRUZ, pelo constante auxílio científico e pela amizade dedicada.
- À Professora FÁTIMA DE SOUZA, pelo excelente trabalho na confecção dos gráficos.
- Ao Professor JOSÉ SEBASTIÃO MARTINS, pela execução das análises estatísticas.
- Aos Colegas e Funcionários do Departamento de Morfologia, pelo incentivo dispensado durante a realização deste trabalho.

- Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelos ensinamentos recebidos, pelo apoio, pela amizade e pela convivência sadia.
- Ao amigo, SEBASTIÃO MEIRA, pelos trabalhos datilográficos e revisão gramatical.
- Ao Senhor CARLOS BERNARD'S PEREIRA, Bioterista, pelo zelo com os animais utilizados neste experimento.
- E de um modo geral, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais	2
1.2. Efeitos da vitamina A nos tecidos	3
1.3. Efeitos da hipervitaminose A nas glândulas exócrinas	5
1.4. Efeitos nas membranas celulares	8
1.5. Interação vitamina A e adrenal	10
1.6. Proposição	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. Material	13
2.2. Técnica de dissecação e pesagem	15
2.3. Técnicas histológicas	15
2.4. Técnicas morfométricas	16
2.4.1. Técnica de CHALKLEY	16
2.4.2. Cariometria	16
2.5. Técnicas estatísticas	18
2.5.1. Teste da mediana	19
3. RESULTADOS	21
3.1. Aspecto geral dos animais	22
3.1.1. Peso corporal	22
3.1.2. Peso glandular	23
3.1.3. Resultados histológicos	27
3.2. Resultados morfométricos	31
3.2.1. Técnica de CHALKLEY	31
3.2.2. Resultados cariométricos	47
4. DISCUSSÃO	67
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo vitamina A designa todos os compostos que têm atividade da vitamina A. Os principais são: o retinol, também denominado de vitamina A₁; o axerofito₁ ou axerol; os ésteres de vitamina A (palmitato e oleato) e o beta caroteno, que é uma pró-vitamina A. Nos tecidos animais o retinol apresenta-se em uma variedade de formas, principalmente na forma esterificada, na forma de palmitato (WEST & cols., 1969).

As substâncias do grupo da vitamina A, que apresentam atividade de vitamina A, são atualmente designadas como "todo - transretinol", e da mesma maneira são nomeados os seus derivados, sendo que o termo vitamina A ainda continua a ser utilizado para todos os compostos desse grupo, bem como compostos de estruturas ainda não determinadas, mas que possuem a atividade biológica do retinol (GANGULY, 1967).

— A maior parte do retinol absorvido

pelo organismo de mamíferos é armazenada no fígado como éster de palmitato na proporção de 100µg por grama de fígado. Ao entrar na circulação, o retinol esterificado liga-se a uma alfa-globulina denominada RBP e circula pelo sangue formando um complexo com uma pré-albumina, o que impede que a RBP seja filtrada pelos glomérulos (MALLIA & cols., 1975).

1.2. EFEITOS DA VITAMINA A NOS TECIDOS

Os efeitos da deficiência de vitamina A (MOORE, 1957, 1964) e da hipervitaminose A (RODAHL, 1950; MOORE, 1957) foram intensamente estudados. MOORE (1957, 1964, 1965) enumerou uma série de anormalidades observadas no rato, coelho, cão, boi, galinha, macaco e homem, no transcorrer de uma avitaminose A. Essas anormalidades seriam representadas por adaptação defeituosa ao escuro, deficiência de crescimento, ceratinização das membranas mucosas, xerofthalmia, propensão a infecções secundárias, falha na modelação óssea com a produção de osso espesso e sem função em lugar de osso mais fino, lesões nervosas, aumento da pressão do líquido cérebro espinhal desenvolvida independentemente ou associada com ossos deformados do crânio, hidrocefalia, anormalidades na reprodução, anormalidades do testículo e aborto, doença da pele e morte. As lesões resultantes da administração de doses elevadas de vitamina A, estudadas por MOORE (1957, 1965), incluem: anormalidades na pele, aumento da pressão do líquido cérebro espinhal, náuseas, vômitos e anormalidades ósseas no homem; fratura óssea, hemorragia interna profusa e fatal, deficiência secundária de vitamina K, mal formações congênitas, fraqueza muscular, perda de pêlo, edema das pálpebras, curvatura pronunciada da coluna vertebral, fraturas espontâneas e parada de crescimento no rato. Uma alteração marcante em ossos foi descrita pela primeira vez por COLLAZO & RODRIGUES (1933), tendo sido observado que o esqueleto de ratos que receberam excesso de concentrado de óleo de fígado de bacalhau tornava-se tão frágil que os animais sofriam fraturas espontâneas dos membros posteriores e anteriores. DAVIS & MOORE (1934), verifica-

ram que em alguns casos as extremidades daquelas fraturas anquilosavam, formando calos ósseos grandes e irregulares. RODAHL & MOORE (1943), observaram que ratos submetidos a uma hipervitaminose A, algumas vezes morriam devido a uma intensa hemorragia interna. MOORE & WANG (1945), constataram hemorragias uterinas em ratas grávidas, quando da administração, em excesso, de óleo de fígado de bacalhau ou de acetato de vitamina A.

A ação direta do excesso de vitamina A sobre a epiderme ocasiona metaplasia e foi estudada "in vitro" por FELL & MELLANBY (1953), WEISS & JAMES (1955) e "in vivo" por LAWRENCE & BERN (1960, 1963) e HARDY (1968).

Quando da aplicação de vitamina A na epiderme observou-se aumento acentuado da espessura de toda a epiderme, hiperplasia, hipertrofia, além de um aumento na atividade mitótica tanto no rato (SABELLA & cols., 1951; BERN & cols., 1955), no camundongo (LAWRENCE & BERN, 1958), como no hamster (LAWRENCE & cols., 1960). Quando aplicada diretamente na vagina de ratas, verificou-se inibição na corneificação do epitélio vaginal (KAHN, 1954).

FRANQUIN & cols. (1969), estudando o efeito da hipervitaminose A sobre o epitélio gengival de ratos, constataram redução marcante na camada córnea, aumento dos grânulos ceratohialinos e espessamento da membrana basal.

Com relação a testículos frente a hipervitaminose A, podemos citar os trabalhos de MADDOCK & cols. (1953), em ratos recém-desmamados e de LAMANO CARVALHO (1977), em ratos jovens, os quais mostraram uma degeneração testicular frente ao excesso de vitamina A.

Trabalhos relativos a hipervitaminose A na musculatura esquelética foram feitos por LOPES & cols. (1979), os quais mostraram uma acentuada atrofia das fibras musculares; no músculo cardíaco COSTA & cols. (1983), também verificaram atrofia de fibras musculares, bem como miocitose e hiperplasia fibrosa.

Com relação a estudos relativos à efeitos de doses excessivas de vitamina A em tecidos de animais em lactação, a literatura pertinente é relativamente escassa, salientando, entretanto, os trabalhos de LOPES & cols. (1972) no rim, LOPES & cols. (1974) no testículo. No rim, foi evidenciado uma diminuição dos glomérulos renais além da diminuição da acidofilia dos citoplasmas celulares dos tubos contorcidos proximais nos animais que receberam doses excessivas de vitamina A durante o período da lactação. Com relação ao testículo foi observado nestes mesmos animais uma diminuição do tamanho dos túbulos seminíferos com redução do índice mitótico no epitélio germinativo.

1.3. EFEITOS DA HIPERVITAMINOSE A NAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS

Os efeitos da hipervitaminose A nas glândulas exócrinas foram estudados principalmente nas glândulas salivares. REGEZI & ROWE (1972), administrando ao rato 50.000 UI diárias de vitamina A, oralmente, durante 16 dias, verificaram na glândula submandibular, hiperplasia e hipertrofia do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi, fendas no RER, formação prematura de grânulos de secreção e espaços acinares dilatados. Estes achados ultra-estruturais foram interpretados como hiperatividade glandular.

Estes mesmos autores, administrando 10.000 UI de vitamina A, oralmente, a cada 2 dias durante 16 semanas, observaram na glândula submandibular degeneração do RER, vacuolização acinar, degranulação ribossômica e restos degenerados dos citoplasmas. Observaram células degeneradas dos ductos estriados. Tal quadro foi interpretado como o de exaustão glandular. Estudando a glândula sublingual do rato submetido à hipervitaminose A, MODIS & cols. (1972), verificaram que as mucinas eram abundantes e fortemente coráveis pelo azul de Alcian, pelo PAS e que eram metacromáticas; e que os ácinos se encontravam dilatados e repletos de muco filamentoso.

LOPES & cols. (1973), estudando os efeitos de doses excessivas de vitamina A nas glândulas salivares linguais posteriores do rato, observaram, na glândula de WEBER, uma diminuição no tamanho das células acinares e dos núcleos, com diminuição da basofilia citoplasmática e do conteúdo de mucopolissacarídeos neutros e ácidos. Estas alterações foram também observadas nas glândulas de VON EBNER, porém com menos evidência. Tais resultados foram também observados por PETENUSCI & cols. (1976), tendo estes autores verificado ainda que estas glândulas apresentavam estruturas normalizadas após 60 dias de recuperação da hipervitaminose.

LOPES & cols. (1974) e PETENUSCI & cols. (1976), estudando a glândula sublingual do rato hipervitaminótico A, verificaram ácinos diminuídos em tamanho, com células mais baixas e núcleos menores. Os grânulos citoplasmáticos apresentaram-se esparsos e reduzidos em número. Os ductos estriados evidenciaram também, redução em tamanho, assim como acidofilia citoplasmática menos intensa. Observaram ainda diminuição do conteúdo de mucopolissacarídeos neutros e ácidos no produto de secreção da glândula. Também a sublingual mostrou histologicamente sinais evidentes de normalização após 60 dias de recuperação.

Com relação a glândula submandibular de ratos submetidos à hipervitaminose A, PETENUSCI & cols. (1976), evidenciaram ácinos e ductos diminuídos em tamanho. Em alguns animais, os ductos demonstraram desorganização, com núcleos diminuídos em tamanho e nem sempre localizados na porção basal da célula. Os grânulos citoplasmáticos apareciam rarefeitos por todo o citoplasma celular. Após 60 dias de recuperação, a glândula mostrou-se histologicamente semelhante à dos controles.

ROSA & cols. (1976) observaram que o conteúdo em ácido siálico e hexosaminas estava diminuído nas glândulas sublingual e submandibular do rato. Entretanto, nenhuma alteração foi observada na glândula parótida.

Em 1977, PICCOLO & cols., estudando os efeitos da hipervitaminose A nas glândulas salivares subman-

dibular, parótida, sublingual e linguais posteriores do cobaio, verificaram as mesmas alterações descritas para o rato.

Em um estudo sobre os efeitos da hipervitaminose A crônica nas glândulas submandibular e sublingual do rato, BUONAROTT & cols. (1977), verificaram não haver diferença estrutural nestas glândulas, quando o animal recebeu 50 UI de vitamina A/grama de peso corporal, durante 53 dias; entretanto, quando o rato recebeu 70 UI da vitamina A/grama de peso corporal, durante 68 dias houve uma diminuição do conteúdo citoplasmático de ácido siálico.

Estudos morfométricos de glândulas salivares de ratos submetidos à hipervitaminose A foram realizados por LOPES & cols. (1980) na glândula sublingual, por LOPES & cols. (1980) na glândula submandibular e na glândula parótida por LOPES & cols. (1979). Os achados morfométricos pela utilização da técnica de CHALKLEY (1943), cariometria e cálculo da área acinar confirmaram os achados histológicos anteriormente estudados por outros autores.

Com relação à estudos da possível reversibilidade das alterações observadas nas glândulas salivares de ratos submetidos à hipervitaminose A podemos citar os trabalhos de LOPES & cols. (1979), os quais observaram na glândula submandibular que o volume nuclear das células glandulares se normaliza após 60 dias de recuperação, enquanto a área dos ácinos e dos ductos estriados apresentaram normalização somente com 90 dias de recuperação. Para a glândula lingual posterior de WEBER os estudos da reversibilidade à hipervitaminose A feitos por LOPES & cols. (1980) demonstraram uma reversão ao estado de normalidade das alterações nas estruturas celulares, somente após 90 dias de recuperação. Observações semelhantes foram feitas por LOPES & cols. (1981) com relação à glândula sublingual.

O estudo morfométrico da reversibilidade das alterações de glândulas palatinas de ratos submetidos à hipervitaminose A foi realizado por LOPES & cols. (1982), e

estes autores observaram um retorno ao normal desta glândula em apenas 30 dias de recuperação.

O papel desempenhado pela vitamina A, quando administrada em excesso em outras glândulas exócrinas, é bastante interessante. A glândula lacrimal extra-orbitária apresentou as células acinares aumentadas de volume, com contornos mais nítidos e com aumento do produto de secreção e os núcleos maiores. Além disso, um aumento da poliploidia nuclear foi evidenciado, dando à glândula um aspecto estrutural envelhecido (COSTA & cols., 1979).

Com relação à glândula nasal lateral do rato, a hipervitaminose A não provocou alteração estrutural na porção mucosa, entretanto, a porção serosa mostrou ácinos menores, com células mais baixas, de citoplasma menos volumoso com núcleos menores e picnóticos quando comparados ao controle.

COSTA & cols. (1978) realizaram um estudo histopatológico e morfométrico na glândula de HARDER do rato. Esta glândula mostrou-se muito sensível aos efeitos provocados pela vitamina A, com algumas alterações estruturais muito semelhantes às apresentadas pelas glândulas salivares, isto é, ácinos de menor volume, células mais baixas e no citoplasma uma diminuição da eosinofilia e da quantidade de vacúolos. Muitas das células acinares apresentaram-se sem forma definida e rompidas; a luz dos ácinos apresentou um produto de secreção esparsa no seu interior e os núcleos menos basófilos e com cromatina menos densa. Esta glândula mostrou um aumento do tecido conjuntivo fibroso entre os ácinos.

1.4. EFEITOS NAS MEMBRANAS CELULARES

A administração de doses excessivas de vitamina A no rato, camundongo, cobaio, coelho e galinha, provoca, inicialmente, um aumento da permeabilidade e posteriormente a destruição das membranas das organelas celulares e da pró

pria membrana plasmática (FELL & THOMAS, 1960; THOMAS, McCLUSKEY, POTTER & WEISSMANN, 1960; DINGLE, 1961; DINGLE, LUCY & FELL, 1961; LUCY, DINGLE & FELL, 1961; FELL, DINGLE & WEBB, 1962; DINGLE & LUCY, 1962; JANOFF & McCLUSKEY, 1962; WEISSMANN, UHR & THOMAS, 1963; GLAUERT, DANIEL, LUCY & DINGLE, 1963; LUCY, LUSCOMB & DINGLE, 1963; DANIEL, DINGLE, GLAUERT & LUCY, 1966; GLICK & KERR, 1968).

Estes autores verificaram também que o rompimento das membranas provocava um aumento da atividade enzimática resultante da ruptura dos lisossomos e consequente liberação de enzimas, tais como: catepsina, fosfatase ácida, beta-glucoronidase, beta-hexosaminidase, hialuronidase e arilsulfatase.

APPELMANS & DE DUVE (1955) e DINGLE (1961), estudando células fracionadas do fígado de rato, verificaram que a liberação daquelas enzimas pelos lisossomos, dependia da temperatura, da concentração hidrogeniônica, do meio e da concentração de vitamina A.

MORRIS & STEELE (1974), utilizando embriões de ratos cultivados em meio de cultura contendo vitamina A, observaram numerosas alterações citológicas, tais como: aumento da área de superfície da membrana plasmática e das membranas das organelas, autofagia e heterofagia dos vacúolos, pequenos vacúolos abertos na superfície celular, distorção dos núcleos com aumento dos espaços intra-membranosos, condensação mitocondrial e morte celular.

YOUNG, POWELL & McMILLAN (1971, citado por RAM & MISRA, 1974), em estudos dos hepatócitos de ratos mantidos em meio de cultura com fenobarbital, observaram proliferação rápida do retículo endoplasmático rugoso. Em face destes achados, RAM & MISRA (1974) tentaram prevenir esta proliferação da organela adicionando ao meio de cultura, fenobarbital e vitamina A. Estes autores puderam verificar que a proliferação rápida do retículo endoplasmático rugoso era aditiva e que a membra-

na deste retículo se comportava de modo diferente das demais membranas celulares frente à vitamina A.

1.5. INTERAÇÃO VITAMINA A E ADRENAL

O mecanismo de ação da vitamina A na produção de numerosas lesões tanto na hipo como na hipervitaminose A resultam não somente como consequência da ação direta da vitamina A nas membranas celulares, mas também da ação indireta de fatores endócrinos, mais especificamente com relação à glândula adrenal.

AMES & cols. (1954), verificaram que ratos submetidos à hipervitaminose A apresentaram hipertrofia e hiperfunção da córtex da adrenal. Esses dados foram confirmados por TAKEKOSHI (1964).

RAM & MISRA (1975), mostraram no rato, que o excesso de vitamina A provocava um aumento na produção e liberação de corticosteróides pela adrenal. Estes corticosteróides lançados na circulação protegiam os lisossomos celulares da ação labilizante da vitamina A. Porém, quando a estimulação da adrenal pela vitamina A era prolongada, a quantidade de adrenocorticóide sintetizado e liberado diminuía, provocando, então, desintegração lisossômica nas células.

1.6. PROPOSIÇÃO

Do que foi exposto, depreende-se que, a ação da vitamina A sobre a glândula de HARDER do rato, foi pouco estudada.

Levando-se em consideração, ainda que a literatura é bastante escassa em relação aos efeitos da hipervitaminose A em animais em lactação, está assim plenamente justificado o interesse na execução do presente trabalho, o qual foi planejado com os seguintes objetivos:

- 1) Verificar as possíveis alterações ponderais e estruturais presentes na glândula de HARDER de ratos em lactação, através de técnicas biométricas e histopatológicas.
- 2) Caracterizar quantitativamente, as possíveis lesões glandulares presentes, causadas pelo excesso de vitamina A ingerida durante a lactação, por meio de técnicas morfométricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Foram utilizados 50 ratos albinos, machos (Rattus norvergicus, variedade Wistar), obtidos do Biotério da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas. Estes animais representam filhos recém-nascidos e em lactação de 10 ratas grávidas divididos em 10 grupos:

GRUPO 1 - Tratado: 5 animais de 5 dias cujas mães receberam injeções diárias de 20.000 UI de vitamina A* durante 5 dias consecutivos, intra-peritonialmente.

GRUPO 2 - Controle: 5 animais de 5 dias cujas mães receberam injeções diárias, inlmente, de solução salina (solução de NaCl a 0,85%) e que serviram de controle para o Grupo 1.

* AROVIT (produtos Roche) Palmitato de vitamina A em solução coloidal hidromiscível.

GRUPO 3 - Tratado: 5 animais de 10 dias cujas mães receberam injeções diárias de 20.000 UI de vitamina A, durante 10 dias consecutivos, intraperitonealmente.

GRUPO 4 - Controle: 5 animais de 10 dias cujas mães receberam injeções diárias, intraperitonealmente, de solução salina (solução de NaCl a 0,85%) e que serviram de controle para o Grupo 3.

GRUPO 5 - Tratado: 5 animais de 15 dias cujas mães receberam injeções diárias de 20.000 UI de vitamina A, durante 10 dias consecutivos, intraperitonealmente.

GRUPO 6 - Controle: 5 animais de 15 dias cujas mães receberam injeções diárias, intraperitonealmente, de solução salina (solução de NaCl a 0,85%) e que serviram de controle para o Grupo 5.

GRUPO 7 - Tratado: 5 animais de 20 dias cujas mães receberam injeções diárias de 20.000 UI de vitamina A, durante 10 dias consecutivos, intraperitonealmente.

GRUPO 8 - Controle: 5 animais de 20 dias cujas mães receberam injeções diárias de solução salina (solução de NaCl a 0,85%), intraperitonealmente e que serviram de controle para o Grupo 7.

GRUPO 9 - Tratado: 5 animais de 25 dias cujas mães receberam injeções diárias de 20.000 UI de vitamina A, durante 10

dias consecutivos, intraperitoniais - mente.

GRUPO 10 - Controle: 5 animais de 25 dias cujas mães receberam injeções diárias de solução salina (solução de NaCl a 0,85%), intraperitonalmente e que serviram de controle para o Grupo 9.

As ratas de todos os Grupos estudados receberam ração comercial e água "ad libitum", e para cada uma delas, após o nascimento, foi mantida uma ninhada de 8 filhotes.

2.2. TÉCNICA DE DISSECAÇÃO E PESAGEM

Os filhotes de todos os Grupos foram pesados diariamente e sacrificados aos 6, 11, 16, 21 e 26 dias de vida pós-natal (5 animais de cada Grupo, totalizando 50 animais) por inalação de éter anestésico.

Em seguida, foram dissecadas as glândulas de HARDER do lado direito e do lado esquerdo dos animais. As glândulas do lado direito foram colocadas em uma solução de Alfac (álcool 80^o - 85 ml, formaldeído-10 ml e ácido acético glacial-5 ml), para fixação. As glândulas do lado esquerdo foram colocadas numa solução de BOUIN (formaldeído-15 ml, ácido pícrico -85 ml e ácido acético glacial-5 ml), para fixação. Após 24 horas, as glândulas fixadas em Alfac e BOUIN foram colocadas em álcool 70^o. Em seguida, as glândulas esquerdas, fixadas em BOUIN, foram pesadas em balança de precisão (Micronal 0,001mg).

2.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

As glândulas de todos os animais

foram desidratadas em álcool, numa série crescente de graduações, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados com 7 micrômetros de espessura e os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) para observação ao microscópio de luz. Neste trabalho foram utilizadas apenas as glândulas es-querdas, fixadas em solução de BOUIN.

2.4. TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS

2.4.1. Técnica de CHALKLEY

Com a finalidade de ava-liar percentualmente as estruturas glandulares, empregou-se neste estudo a técnica de CHALKLEY (1943). Utilizou-se, para tal, uma ocular preparada com 4 pontos padrão e uma objetiva de imersão (100X). Cada ponto correspondia a extremidade livre de uma seta e as estruturas histológicas escolhidas (citoplasma, núcleo, in-terstício e luz) das glândulas, foram registradas individualmen-te. Foram determinadas quantas vezes as estruturas eram atingi-das pelos pontos padrão e contados 1000 pontos para cada glându-la de cada animal. Os valores numéricos obtidos das estruturas glandulares dos animais tratados e controles foram transformados em valores percentuais. Esta percentagem de pontos por estrutura indica o volume relativo para cada estrutura. Para comparação desses volumes relativos nos diversos grupos, os dados percentu-ais sofreram uma transformação angular.

2.4.2. Cariometria

Os volumes reais dos nú-cleos das células glandulares dos diversos grupos experimentais foram obtidos através de medidas cariométricas.

Os cortes foram focaliza-dos ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (100X), ao qual era adaptada uma câmara clara (Olimpus).

Os núcleos das células glandulares foram projetados sobre papel, com um aumento final de 1.140X. As imagens obtidas, em número de 100 para cada animal dos grupos estudados, foram contornadas com lápis número 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas ou arredondadas dos núcleos. Para a obtenção dos volumes, os eixos maior e menor foram medidos, obtendo-se ainda por meio da média geométrica dos dois primeiros, um terceiro eixo. Em seguida, foi aplicada a fórmula do volume do elipsóide de acordo com VALERI & cols. (1967).

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot \sqrt{D_1 \cdot D_2}$$

onde D_1 e D_2 representam os eixos maior e menor respectivamente.

2.4.2.1. Cálculo da Constante para a equação do volume elipsóide, quando a ampliação é de 1.140X.

A equação matemática do volume elipsóide é:

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b \cdot c$$

em que a, b, c, são os três semi-eixos do sólido. Se quiséssemos escrever a equação em termos de eixos e não de semi-eixos, teríamos:

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{D_1}{2} \cdot \frac{D_2}{2} \cdot \frac{D_3}{2}$$

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot D_3$$

No caso do núcleo de uma célula que é observado em duas dimensões, apenas o terceiro eixo pode ser estimado como a média geométrica dos outros dois. Temos assim:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_1 \cdot D_2 \sqrt{D_1 \cdot D_2}$$

D indica o comprimento real dos eixos em micrômetros. Como o valor medido na projeção é feito em milímetros, o valor D valerá 1.000X menos que este valor em milímetros. Por sua vez o valor 1.000 D está ampliado 1.140X, razão porque é preciso dividi-lo por 1.140X para ter-se o valor real do eixo. Assim, temos:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \frac{1.000 D_1}{1.140} \cdot \frac{1.000 D_2}{1.140} \cdot \sqrt{\frac{1.000 D_1 \cdot 1.000 D_2}{1.140}}$$

Efetuando-se as operações aritméticas indicadas, têm-se:

$$V = 0,35341426 \cdot D_1 \cdot D_2 \sqrt{D_1 \cdot D_2}$$

2.5. TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

Para o estudo dos volumes relativos após transformação angular das estruturas estudadas com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943), (citoplasma, núcleo, interstício e luz) entre grupos controles e tratados, empregou-se a análise de variância.

Com o objetivo de comparar-

se os dados obtidos com o emprego da cariometria empregou-se o teste não paramétrico da mediana (SIEGEL, 1956).

2.5.1. Teste da Mediana (SIEGEL, 1956)

Nos casos em que se desconhece a distribuição das populações das quais provêm as amostras, a comparação destas amostras se aplica com maior sucesso que a comparação das médias.

Esse teste permite concluir se duas amostras provêm de populações que têm a mesma mediana.

O procedimento prático consiste em ordenar, conjuntamente, os valores das duas amostras, de maneira a obter o valor central (mediana) correspondente a todos os dados da amostragem.

A seguir, constrói-se um quadro, como o que se segue:

	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	TOTAL
Valores menores que a mediana	A	B	A + B
Valores iguais ou maiores que a mediana	C	D	C + B
Total	A + C	B + D	N=A+B+C+D

Construindo-se o quadro, a aplicação do teste do qui-quadrado (χ^2) permite decidir quanto a aceitação de H_0 , que admite serem as duas amostras provenientes de populações de mesma mediana.

A variável χ^2 é calculada pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{N \left(|A.D. - B.C| - \frac{N}{2} \right)^2}{(A+B) \cdot (C+D) \cdot (A+C) \cdot (B+D)}$$

Estabelecendo α , que neste trabalho foi tomado a um nível de 95% ($\alpha = 0,05$), e com 1 grau de liberdade, obtêm-se o valor de χ^2 tabelado.

A hipótese H_0 é rejeitada sempre que o valor calculado de χ^2 for maior ou igual ao seu valor tabelado.

3. RESULTADOS

3.1. ASPECTO GERAL DOS ANIMAIS

A dosagem de vitamina A recebida pelos filhotes através do leite materno, não provocou mal formações visíveis nesses animais considerados tratados. Pode-se observar que esses animais, durante todo o experimento, apresentaram um comportamento normal no que concerne a postura, movimentos corporais, apetite e desenvolvimento. Não foi observada morte prematura em nenhum caso.

3.1.1. Peso Corporal

Na figura 1 estão projetadas as médias dos pesos corporais dos ratos controles e tratados com vitamina A e sacrificados no 6º dia de vida (Grupos 2 e 1).

Nesta figura, observa-se que o peso corporal dos animais controles variou entre 5,70g (1º dia do experimento) e 11,68g (6º dia do experimento), apresentando um índice de crescimento de 0,99, enquanto que nos animais tratados com vitamina A, (Grupo 1), o peso corporal situou-se entre 6,70g (1º dia do experimento) e 12,92g (6º dia do experimento), com, portanto, um índice de crescimento igual a 1,03. Estes dados sugerem um crescimento semelhante entre os dois Grupos de animais.

Os animais submetidos ao tratamento com vitamina A e sacrificados no 11º dia de vida, apresentaram da mesma forma que os Grupos iniciais um desenvolvimento semelhante. Assim é que os animais controles variavam de 6,38g (1º dia do experimento) para 18,34g (11º dia do experimento) e os tratados de 6,02g (1º dia do experimento) para 16,66g (11º dia do experimento), mostrando um índice de crescimento igual a 1,08 e 0,96, respectivamente (Figura 2).

Somente os Grupos de animais controles e tratados sacrificados no 16º dia, apesar de apresentarem crescimentos semelhantes, mostraram uma pequena variação de peso quando comparados, ou seja: os animais controles se desenvolveram com maior peso do que os tratados. Tais pesos foram - 7,60g (1º dia) e 31,30g (16º dia) para os controles (Índice de crescimento = 1,48), 6,44g (1º dia) e 25,80g (16º dia) para os tratados (Índice de crescimento = 1,21), (Figura 3).

As figuras 4 e 5 mostram que o crescimento dos ratos controles e tratados, sacrificados no 21º e 26º dias de vida apresentaram um comportamento semelhante, sem diferenças marcantes dos pesos dos controles e tratados. Os pesos corporais médios dos ratos controles, sacrificados ao 21º dia foram: 5,70g (1º dia) e 37,06g (21º dia), apresentando um Índice de crescimento igual a 1,49, enquanto os tratados variaram seu peso de 5,70g (1º dia) para 34,84g (21º dia), apresentando um Índice de crescimento igual a 1,38. Para os animais sacrificados no 26º dia de vida os pesos corporais absolutos foram os seguintes: controles - 6,00g (1º dia) para 57,02g (26º dia) (Índice de crescimento = 1,96); tratados - 6,78g (1º dia) para 61,14g (26º dia) (Índice de crescimento = 2,09).

Pelos Índices de crescimento, verificamos que os ratos controles em todos os Grupos estudados, quando comparados aos tratados, apresentaram um crescimento bastante semelhante.

3.1.2. Peso Glandular

Quando examinamos a tabela 1, verificamos que no final do experimento, para cada Grupo estudado, os valores dos pesos médios das glândulas de HARDER dos animais tratados com vitamina A e sacrificados no 6º, 11º, 16º, 21º e 26º dias de vida (3,6mg, 7,1mg, 16,4mg, 25,1mg e 39,4mg respectivamente) são sempre maiores que os dos ratos controles (3,5mg

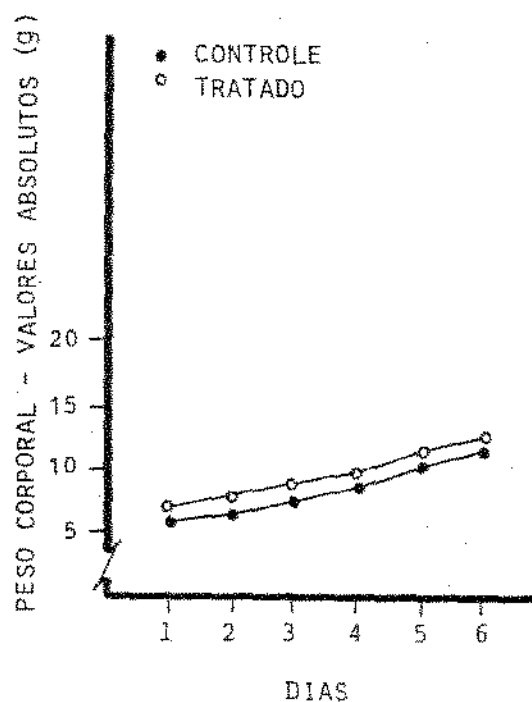


FIGURA 1 - Projeção gráfica das médias dos pesos corporais dos animais controles e tratados sacrificados no 60 dia de vida.

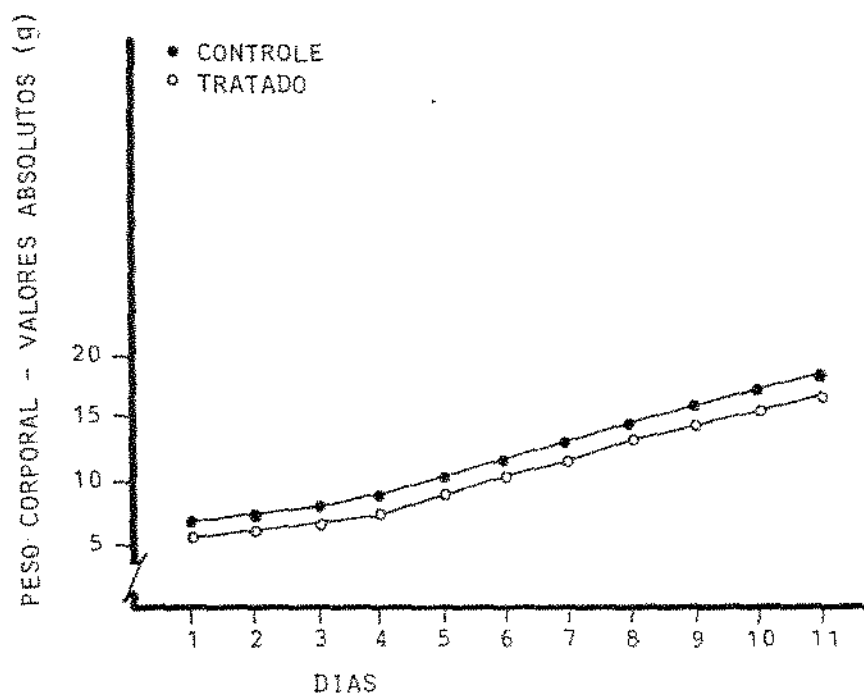


FIGURA 2 - Projeção gráfica das médias dos pesos corporais dos animais controles e tratados sacrificados no 110 dia de vida.

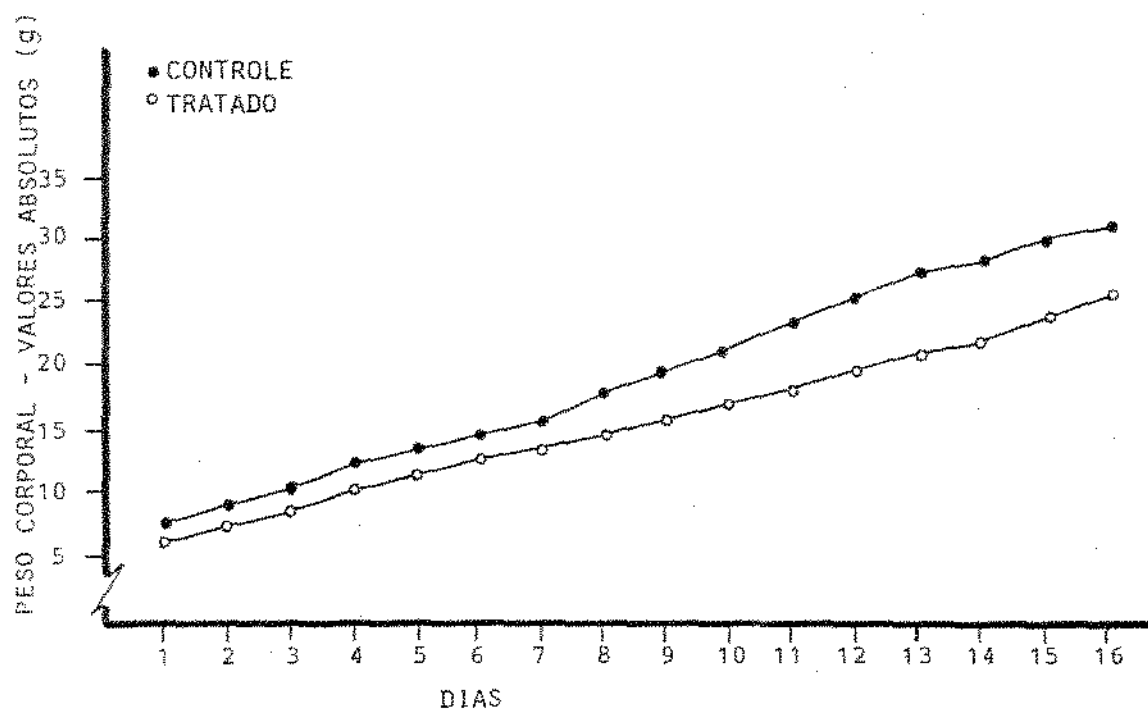


FIGURA 3 - Projeção gráfica das médias dos pesos corporais dos animais controles e tratados sacrificados no 16º dia de vida.

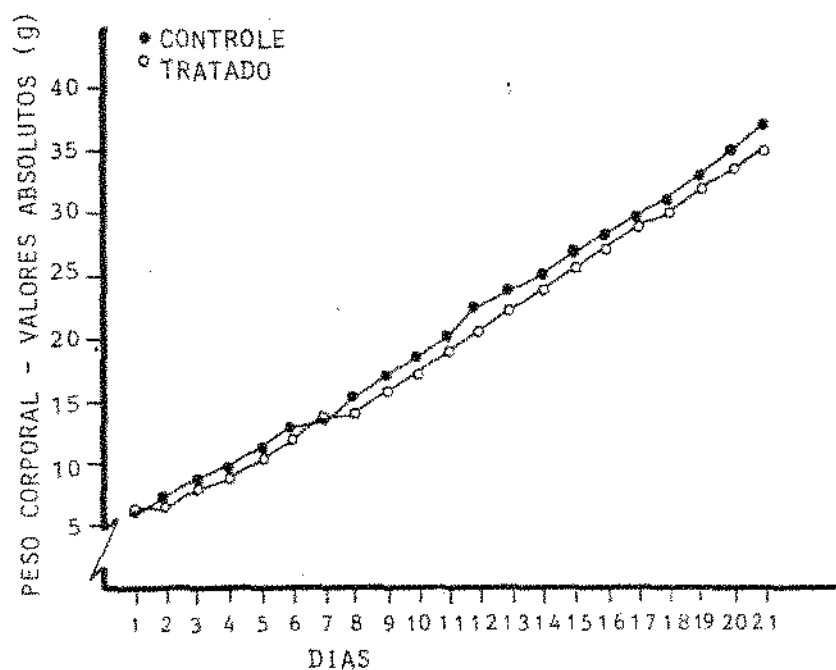


FIGURA 4 - Projeção gráfica das médias dos pesos corporais dos animais controles e tratados sacrificados no 21º dia de vida.

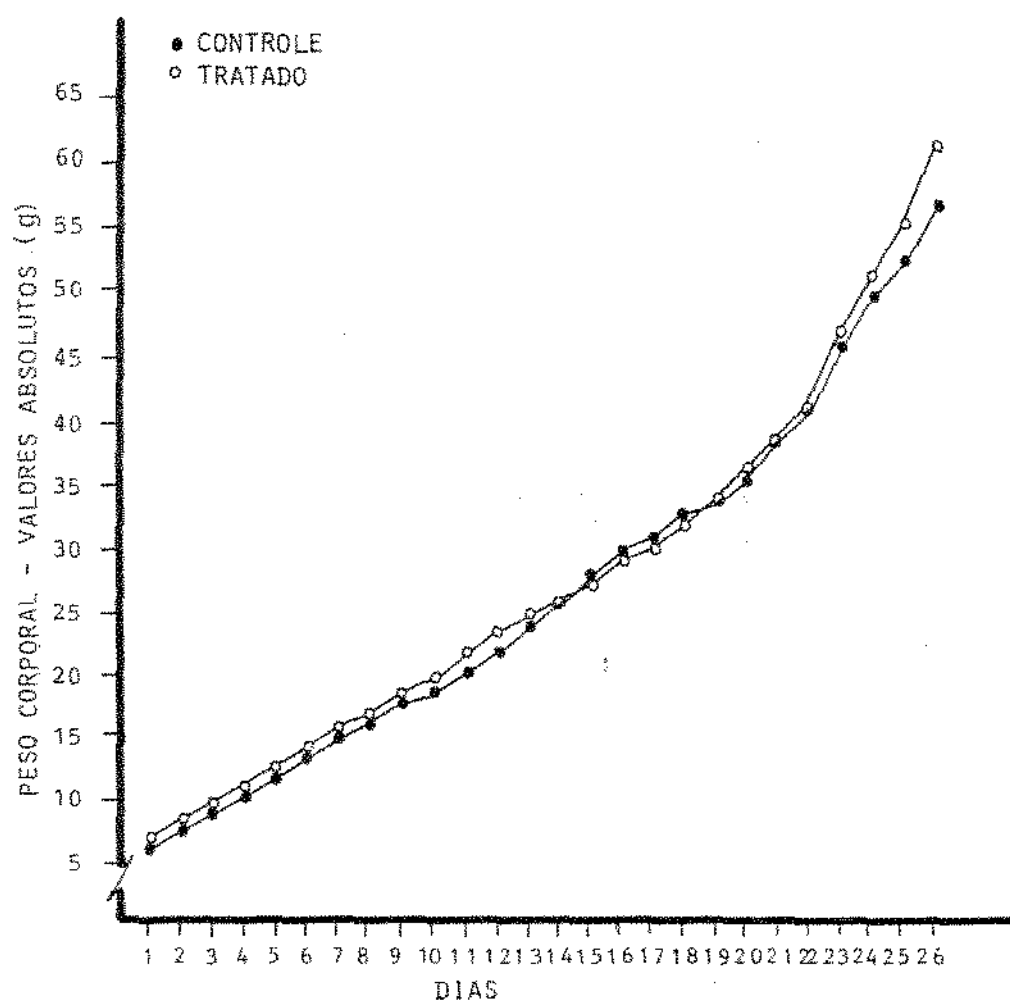


FIGURA 5 - Projeção gráfica das médias dos pesos corporais dos animais controles e tratados sacrificados no 26º dia de vida.

4,7mg, 13,8mg, 24,5mg e 30,2mg, respectivamente), quando comparados aos seus pares.

TABELA 1 - Média dos pesos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados.

CONTROLES		TRATADOS	
GRUPO	PESO MÉDIO(mg)	GRUPO	PESO MÉDIO(mg)
2	3,5	1	3,6
4	4,7	3	7,1
6	13,8	5	16,4
8	24,5	7	25,1
10	30,2	9	39,4

Do exposto, conclui-se que a vitamina A, provocou uma hiperplasia glandular nos animais tratados quando comparados aos controles durante todo o período estudado.

3.1.3. Resultados Histológicos

Em todos os períodos estudados a glândula de HARDER dos ratos controles mostrou-se histologicamente do tipo túbulo-alveolar composta com secreção apócrina. Estas glândulas estavam envolvidas por uma cápsula de conjuntivo fibroso, que nos animais mais jovens mostrou-se mais espessa e nos animais mais velhos, mais delgada. Esta cápsula emitiu séptos para o interior dividindo-a em lóbos e lóbulos. Os ácinos glandulares apresentaram-se constituídos por células cilíndrico-piramidais altas com citoplasma repleto de vacúolos. Os núcleos das células secretoras, esféricos, localizados na porção basal das células, apresentando um nucléolo bastante evidente, corado intensamente pela hematoxilina (Figuras 6A, C, E e 7A, C e E).

Este aspecto histológico

observados nos controles está de acordo com as descrições de GRAF FLIN (1942) e COSTA & cols. (1978).

As glândulas dos animais tratados mostraram-se com alterações bem evidentes. Assim é que o tecido conjuntivo intersticial apresentou-se aumentado em todos os períodos estudados. O citoplasma das células secretoras mostrou-se com menor altura que os controles (Figuras 6D e F e 7D e F), e menos basófilo nos animais sacrificados no 6º, 11º e 16º dias de vida (Figuras 6D e 7D). Nos demais Grupos estudados o aspecto assemelhou-se aos controles. A luz acinar conseqüentemente apresentou-se aumentada. Um fato interessante que nos chamou a atenção foi que nos tratados ocorreu um desenvolvimento mais precoce da glândula, evidenciando também, nestes animais, uma maior atividade secretora da glândula (Figuras 6B, D e F). Este fato foi comprovado pela observação de uma maior eosinofilia citoplasmática nos animais tratados e sacrificados no 21º e 26º dias de vida, em relação aos animais controles (Figuras 6F e 7F).

FIGURA 6 - (A) - Rato controle. Aspecto histológico da glândula no 6º dia de vida. HE. Aumento 150X.

(B) - Rato tratado. Aspecto histológico da glândula no 6º dia de vida. Pode-se observar um desenvolvimento precoce da glândula, bem como uma maior quantidade do tecido conjuntivo intersticial. HE. Aumento 150X.

(C) - Rato controle (16º dia). Ácinos glandulares normais, com concentração do produto de secreção na luz acinar. HE. Aumento 150X.

(D) - Rato tratado (16º dia). Aspecto histológico da glândula. Observa-se uma maior atividade secretora da glândula, bem como a luz acinar aumentada. HE. Aumento 150X.

(E) - Rato controle (26º dia). Aspecto histológico da glândula. HE. Aumento 150X.

(F) - Rato tratado (26º dia). Aspecto histológico da glândula. Observa-se, além de uma estrutura glandular semelhante a normal, uma acidofilia citoplasmática acentuada. HE. Aumento 150X.

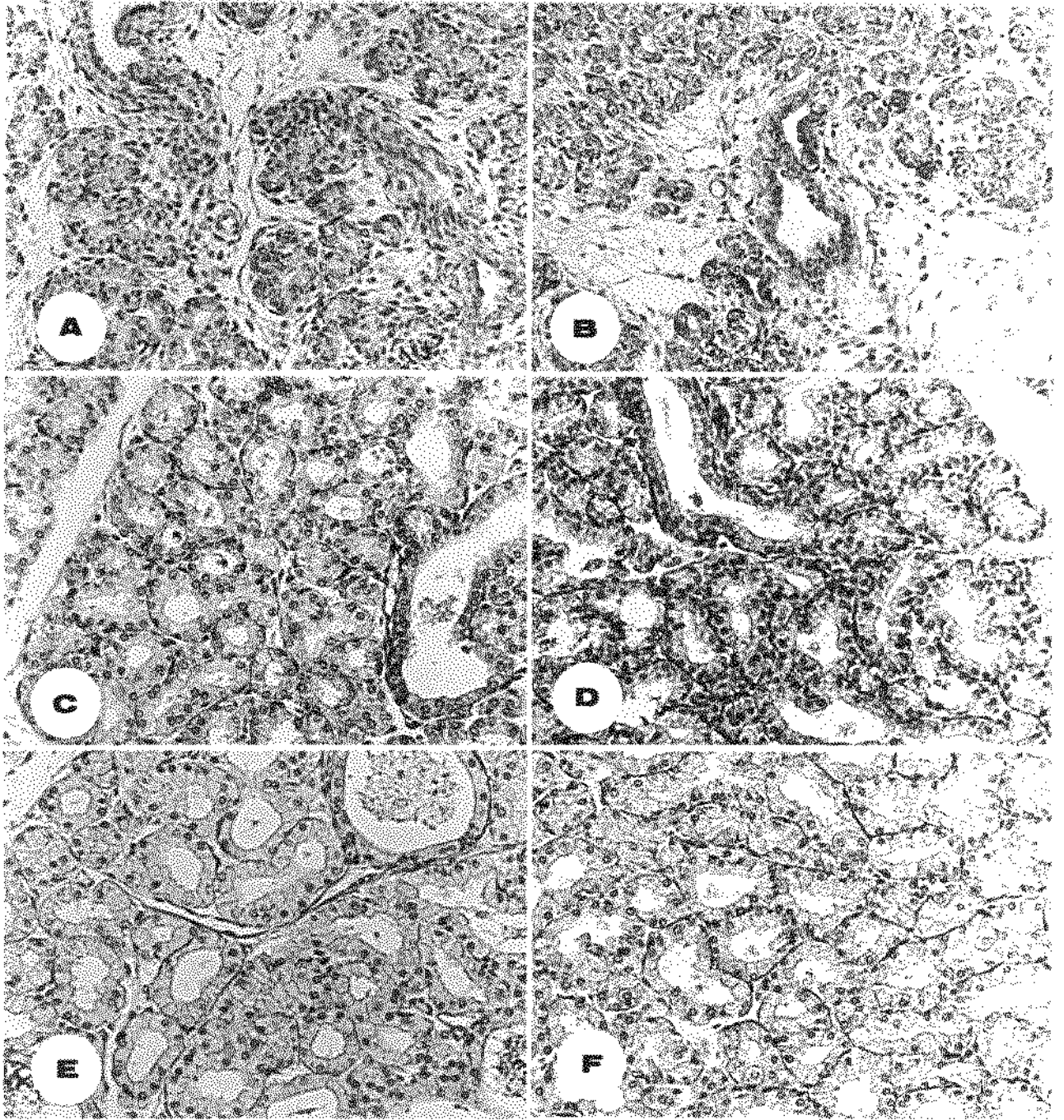
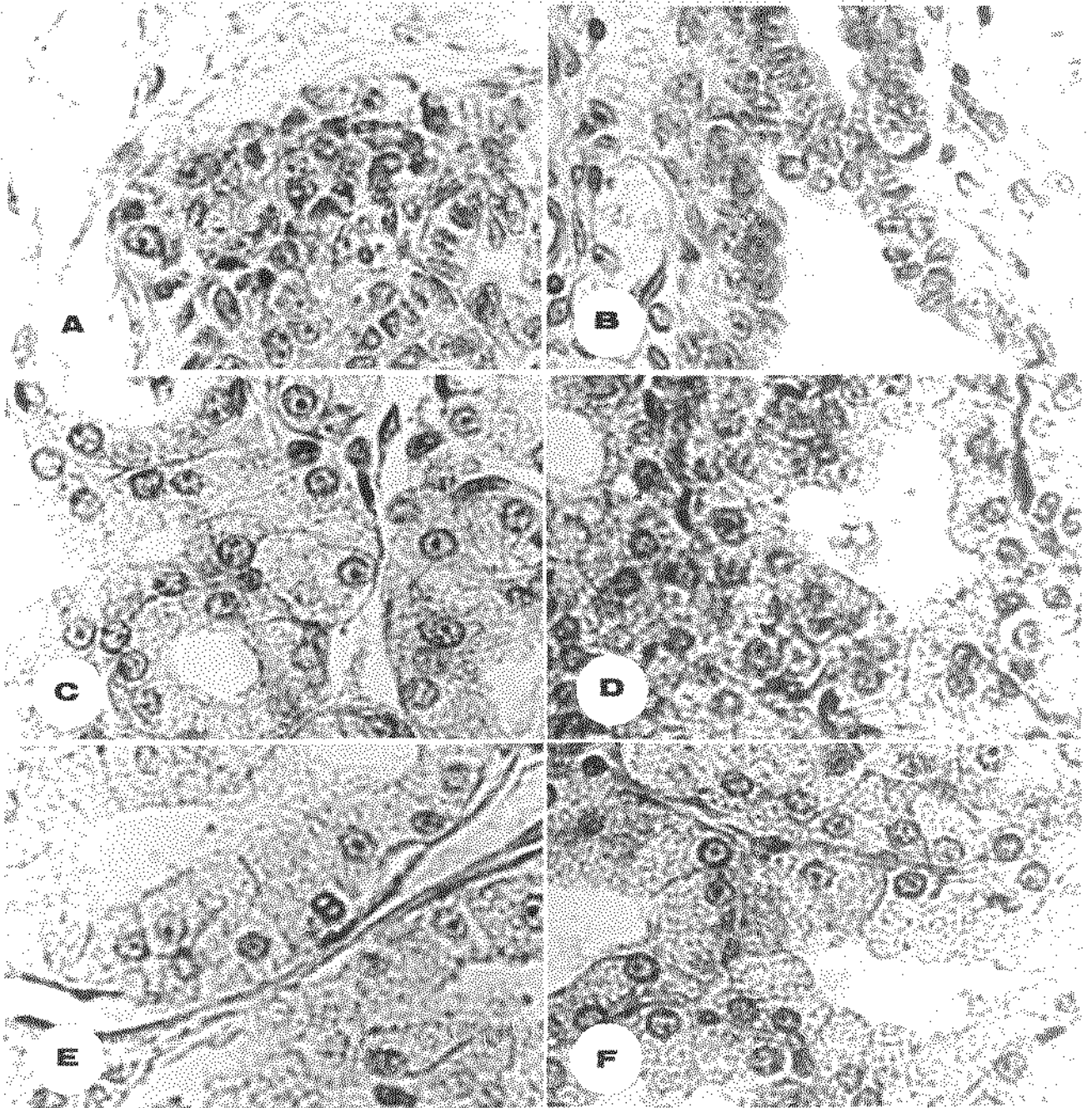


FIGURA 7 - (A-C-E) - Ratos controles. Aspectos histológicos da glândula normal de ratos com 6, 16 e 26 dias de vida, respectivamente. HE. Aumento 500X.

(B-D-F) - Ratos tratados. Aspectos histológicos das glândulas dos animais hipervitaminóticos com 6, 16 e 26 dias de vida, respectivamente. Observa-se uma menor altura das células secretoras, grânulos de secreção bem evidenciados e uma maior acidofilia citoplasmática, quando comparados aos controles. HE. Aumento 500X.



3.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

3.2.1. Técnica de CHALKLEY

Na Tabela 2 estão expressos os valores percentuais e as médias destes valores das estruturas glandulares estudadas, isto é, citoplasma e núcleo das células secretoras, interstício (tecido conjuntivo, vasos e espaços) e luz dos ácinos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 6º dia de vida, obtidos com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943).

A representação gráfica destes valores está expressa na Figura 8.

TABELA 2 - Valores percentuais, média destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 6º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
48,2	37,7	25,8	26,2	24,2	31,2	1,8	4,9
46,0	38,1	27,1	26,4	25,0	30,1	1,9	5,5
45,2	36,9	27,3	27,3	25,1	31,2	2,4	4,6
47,4	37,5	24,8	26,1	26,1	31,1	1,7	5,3
44,8	36,8	25,5	24,8	27,3	31,8	2,4	6,6
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
46,32	37,40	26,10	26,16	25,54	31,08	2,04	5,38
($\pm 1,45$)	($\pm 0,55$)	($\pm 1,07$)	($\pm 0,90$)	($\pm 1,19$)	($\pm 0,61$)	($\pm 0,34$)	($\pm 0,77$)

Analisando-se esta Tabela, verificou-se que, para o citoplasma das células secretoras, foram obtidos os valores percentuais médios iguais a 46,32 ($\pm 1,45$) para os controles e 37,40 ($\pm 0,55$) para os tratados. Quando da

análise de variância após transformação angular (Tabela 7), verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados nos animais controles em relação aos tratados.

Observando-se os valores percentuais médios para os núcleos, verificou-se não haver diferença entre esses valores para ambos os Grupos de animais estudados, isto é, 26,10 ($\pm 1,07$) para os controles e 27,16 ($\pm 0,90$) para os tratados. A análise de variância comprovou este fato (Tabela 7).

Para o tecido intersticial, a diferença dos valores médios obtida para os animais controles (25,54 $\pm 1,19$) e tratados (31,08 $\pm 0,61$) apresentou diferença estatisticamente significativa após a aplicação da técnica de análise de variância (Tabela 7).

Com relação a luz dos ácinos, obteve-se um valor médio igual a 2,04 ($\pm 0,34$) para os controles, enquanto os tratados apresentaram-se com valores médios iguais a 5,38 ($\pm 0,77$). A análise de variância comprovou uma diferença estatisticamente significativa entre estes dados destes Grupos (Tabela 7).

A vitamina A provocou uma diminuição relativa no citoplasma das células secretoras e um aumento tanto do tecido intersticial quanto da luz glandular dos animais tratados, quando comparado aos controles.

Na Tabela 3, acham-se expressos os valores percentuais e as médias destes valores das estruturas estudadas das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 119 dia de vida, obtidos com emprego da técnica de CHALKLEY (1943). Na Figura 9, estão representados, graficamente, estes valores.

Após a análise desta Tabela, verificou-se ainda uma diferença entre os valores do citoplasma (44,56 $\pm 1,97$ nos controles e 41,50 $\pm 0,71$ nos tratados), como também para a luz acinar (40,70 $\pm 0,63$ para os controles e 6,88

nos tratados). Nestes animais não foram observadas diferenças entre os valores percentuais dos núcleos ($25,18 \pm 0,94$ nos controles e $25,56 \pm 2,50$ nos tratados) e do tecido intersticial ($4,70 \pm 0,73$ nos controles e $6,88 \pm 0,68$ nos tratados). A análise de variância comprovou estes fatos (Tabela 8), mostrando que a vitamina A nestes animais provocou uma diminuição relativa do citoplasma e um aumento da luz acinar. Com relação ao tecido intersticial, mesmo que este tenha aumentado aparentemente nos tratados, estatisticamente, não foi significativo.

TABELA 3 - Valores percentuais, média destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 119 dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
43,8	37,7	26,3	23,2	24,6	26,8	5,3	7,8
47,4	42,2	24,6	24,6	23,9	26,4	4,1	6,8
44,5	40,6	25,4	26,3	24,7	27,2	5,4	5,9
45,1	41,0	25,7	26,6	24,6	25,4	4,6	7,0
42,0	41,5	23,9	25,1	30,0	26,5	4,1	6,9
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
44,56	41,50	25,18	25,16	25,56	26,46	4,70	6,88
($\pm 1,97$)	($\pm 0,71$)	($\pm 0,94$)	($\pm 1,37$)	($\pm 2,50$)	($\pm 0,67$)	($\pm 0,63$)	($\pm 0,68$)

Quando se analisou a Tabela 4, a qual mostra expressos os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 169 dia de vida, obtidos com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943), verificou-se para o citoplasma dos animais controles um valor médio igual a 55,40 ($\pm 1,93$), enquanto os tratados apresentaram-se com valores iguais a 50,14 ($\pm 1,59$). A análise de variância (Tabela 9) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os valores destes Grupos.

Com relação ao tecido intersticial também foram observadas diferenças entre os valores destes 2 Grupos, ou seja, 14,64 ($\pm 0,88$) para os controles e 19,90 ($\pm 0,80$) para os tratados. Estas diferenças foram comprovadas estatisticamente pela análise de variância (Tabela 9).

Os valores percentuais, médias dos núcleos das células secretoras e da luz acinar, apresentaram-se semelhantes entre os 2 Grupos estudados, ou seja, 19,06 ($\pm 1,14$) para os controles e 18,60 ($\pm 0,85$) para os tratados e 10,90 ($\pm 1,30$) para os controles e 11,12 ($\pm 1,40$) para os tratados, respectivamente. Este fato foi comprovado com a utilização da análise de variância (Tabela 9).

A representação gráfica dos valores percentuais destas estruturas está representada na Figura 10. Nestes grupos de animais a vitamina A provocou uma diminuição do citoplasma e um aumento do tecido intersticial das glândulas dos animais tratados em relação aos controles.

TABELA 4 - Valores percentuais, média destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 169 dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
57,5	51,2	19,1	17,6	13,8	18,6	9,6	12,6
52,9	51,5	20,8	18,9	14,3	19,7	12,0	9,6
57,0	50,5	18,2	17,8	15,0	20,2	9,8	10,6
55,5	47,5	17,9	19,3	16,0	20,6	10,6	12,6
54,1	50,0	19,3	19,4	14,1	20,4	12,5	10,2
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
55,40	50,14	19,06	18,60	14,64	19,90	10,90	11,12
($\pm 1,93$)	($\pm 1,59$)	($\pm 1,14$)	($\pm 0,85$)	($\pm 0,88$)	($\pm 0,80$)	($\pm 1,30$)	($\pm 1,40$)

Os valores percentuais e

as médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados com vitamina A, sacrificados no 21º dia de vida estão representados na Tabela 5 e graficamente na Figura 11.

Da sua análise verificou-se haver ainda, neste período experimental, diferenças entre estruturas das glândulas dos 2 Grupos. Assim é que o interstício nos animais tratados apresentou-se maior ($18,70 \pm 0,60$) que os dos animais controles ($14,44 \pm 1,55$). Tal fato foi comprovado com o emprego da análise de variância (Tabela 10).

Com relação à luz acinar, a análise da Tabela 5 e o emprego da análise de variância (Tabela 10) comprovaram uma diferença estatisticamente maior nos animais controles em relação aos tratados ($17,36 \pm 2,72$ e $12,36 \pm 0,65$, respectivamente).

A vitamina A provocou nestes animais um aumento do interstício e diminuição da luz acinar dos tratados quando comparados aos controles.

TABELA 5 - Valores percentuais, média destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 21º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
53,4	53,0	17,7	15,4	12,1	19,5	16,8	11,9
50,9	52,1	14,0	15,8	13,6	19,0	21,5	13,1
54,7	51,6	15,2	16,8	15,7	18,6	14,4	13,0
50,3	53,5	16,1	16,5	15,3	17,9	18,3	12,1
51,2	52,9	17,5	16,9	15,5	18,5	15,8	11,7
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
52,10	52,62	16,10	16,28	14,44	18,70	17,36	12,36
($\pm 1,87$)	($\pm 0,76$)	($\pm 1,56$)	($\pm 0,65$)	($\pm 1,55$)	($\pm 0,60$)	($\pm 2,72$)	($\pm 0,65$)

Os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas, citoplasma, núcleo, tecido intersticial e luz acinar das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida, obtidos com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943) estão expressos na Tabela 6. Graficamente, os valores das médias das estruturas estão expressos na Figura 12.

Pela análise desta Tabela foi possível verificar uma semelhança nos valores percentuais dos animais controles e tratados em todas as estruturas estudadas, ou seja, 51,78 ($\pm 2,65$) e 51,02 ($\pm 0,54$) (citoplasma); 14,08 ($\pm 2,77$) e 12,20 ($\pm 1,48$) (núcleo); 19,36 ($\pm 4,49$) e 18,96 ($\pm 2,18$) (interstício); 14,78 ($\pm 3,59$) e 17,88 ($\pm 1,27$) (luz). Estes fatos foram comprovados com o emprego da análise de variância (Tabela 11), evidenciando que nesta época da vida dos animais em experimento a vitamina A deixou de provocar alterações significativas nas estruturas estudadas quando comparados animais controles com animais tratados.

TABELA 6 - Valores percentuais, média destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
49,4	50,4	12,2	10,0	27,0	20,1	11,4	19,5
52,1	50,9	15,5	13,0	18,4	18,9	14,0	17,5
56,2	51,8	12,5	13,8	15,4	15,8	15,9	18,6
50,7	51,3	11,9	12,7	17,0	18,3	20,4	17,7
50,5	50,7	18,3	11,5	19,0	21,7	12,2	16,1
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
51,78	51,02	14,08	12,20	19,36	18,96	14,78	17,88
($\pm 2,65$)	($\pm 0,54$)	($\pm 2,77$)	($\pm 1,48$)	($\pm 4,49$)	($\pm 2,19$)	($\pm 2,59$)	($\pm 1,27$)

TABELA 7 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados, sacrificados com 6 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	198,92	1	198,92	166,33**
Erro	9,57	7	1,20	
Total	200,49	8		
Núcleo				
Entre grupos	0,008	1	0,008	0,008 NS
Erro	7,792	7	0,97	
Total	7,800	8		
Interstício				
Entre grupos	76,73	1	76,73	85,28 **
Erro	7,20	7	0,90	
Total	83,93	8		
Luz				
Entre grupos	27,89	1	27,89	79,68 **
Erro	2,80	7	0,35	
Total	30,69	8		

** = significativo ao nível de 1%, valor crítico de F = 11,2

NS = não significativo.

TABELA 8 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados, sacrificados com 11 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	23,41	1	23,41	10,68 *
Erro	17,53	7	2,19	
Total	40,94	8		
Núcleo				
Entre grupos	0,002	1	0,002	0,001 NS
Erro	11,078	7	1,47	
Total	11,080	8		
Interstício				
Entre grupos	2,03	1	2,03	0,60 NS
Erro	26,84	7	3,36	
Total	28,87	8		
Luz				
Entre grupos	11,88	1	11,88	27,89 **
Erro	3,41	7	0,43	
Total	15,29	8		

* = significativo ao nível de 5%, valor crítico de $F = 5,32$

** = significativo ao nível de 1%, valor crítico de $F = 11,2$

NS = não significativo.

TABELA 9 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados, sacrificados com 16 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	69,16	1	69,16	22,11 **
Erro	25,01	7	3,13	
Total	94,17	8		
Núcleo				
Entre grupos	0,53	1	0,53	0,52 NS
Erro	8,03	7	1,01	
Total	8,56	8		
Interstício				
Entre grupos	69,17	1	69,17	97,89 **
Erro	5,65	7	0,71	
Total	74,82	8		
Luz				
Entre grupos	0,12	1	0,12	0,07 NS
Erro	14,57	7	1,82	
Total	14,69	8		

** = significativo ao nível de 1%, valor crítico de F = 11,2

NS = não significativo.

TABELA 10 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados, sacrificados com 21 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	
Citoplasma					
Entre grupos	0,67	1	0,67	0,33	NS
Erro	16,24	7	2,03		
Total	16,91	8			
Núcleo					
Entre grupos	0,08	1	0,08	0,05	NS
Erro	11,45	7	1,43		
Total	11,53	8			
Interstício					
Entre grupos	45,37	1	45,37	32,84	**
Erro	11,05	7	1,38		
Total	56,42	8			
Luz					
Entre grupos	62,50	1	62,50	16,02	**
Erro	31,30	7	3,90		
Total	93,70	8			

** = significativo ao nível de 1%, valor crítico de F = 11,2

NS = não significativo.

TABELA 11 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados, sacrificados com 26 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	
Citoplasma					
Entre grupos	1,44	1	1,44	0,40	NS
Erro	29,30	7	3,66		
Total	30,74	8			
Núcleo					
Entre grupos	8,83	1	8,83	1,79	NS
Erro	39,39	7	4,92		
Total	48,22	8			
Interstício					
Entre grupos	0,40	1	0,40	0,03	NS
Erro	99,90	7	12,49		
Total	100,30	8			
Luz					
Entre grupos	24,03	1	24,03	3,31	NS
Erro	58,01	7	7,25		
Total	82,04	8			

NS = não significativo.

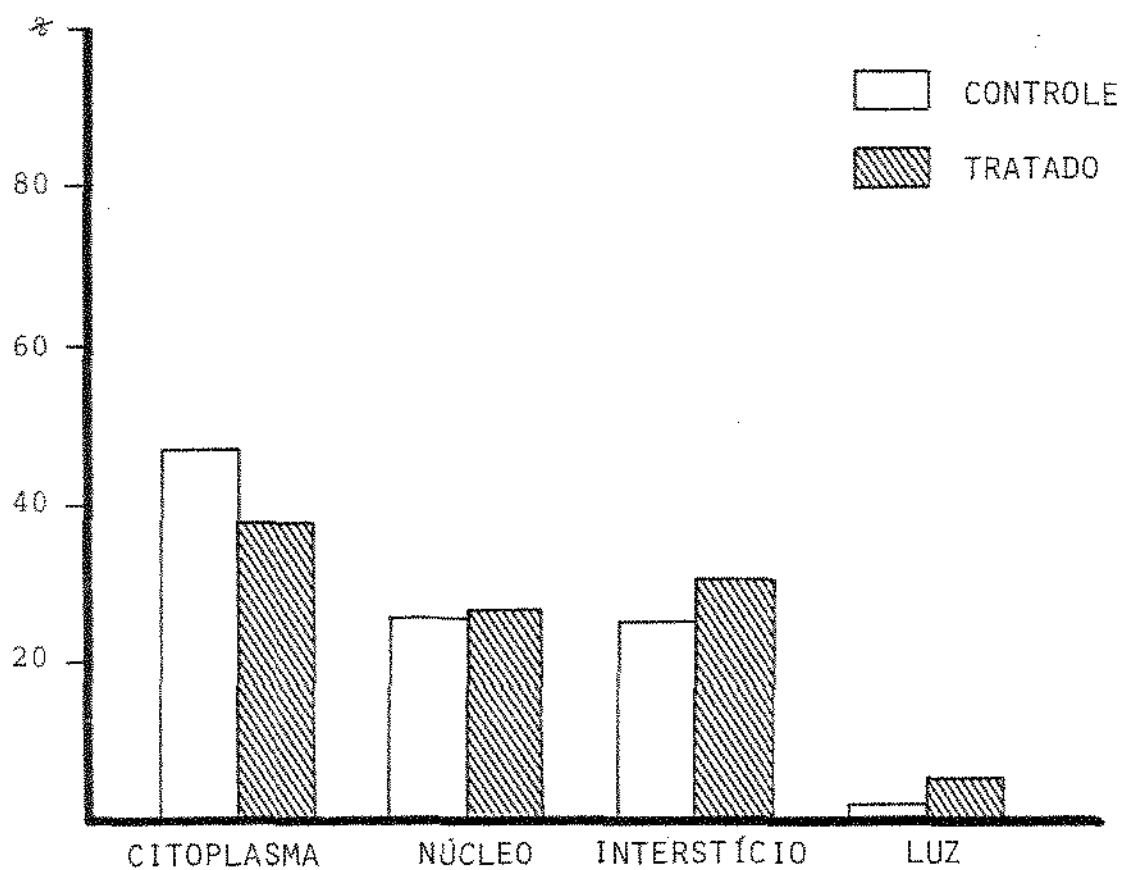


FIGURA 8 - Média dos valores correspondentes a percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados sacrificados no 60º dia de vida.

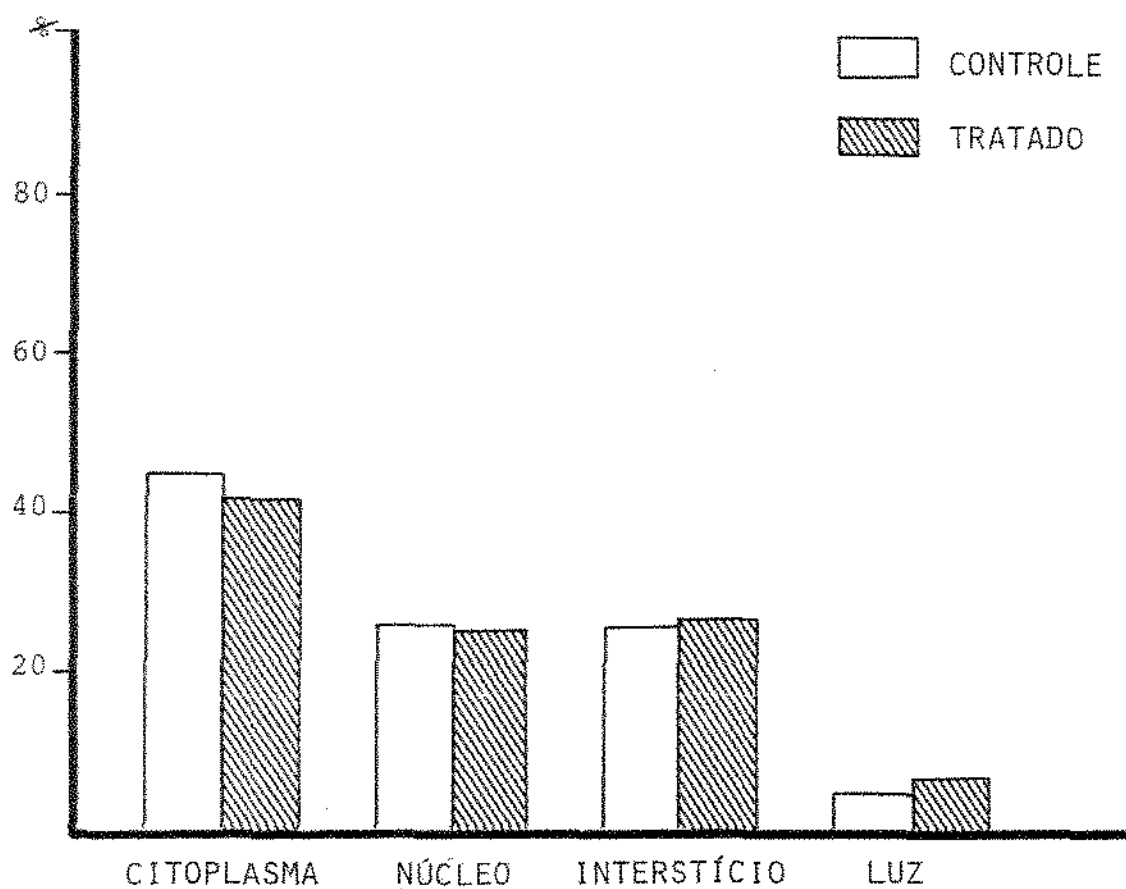


FIGURA 9 - Média dos valores correspondentes a percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados sacrificados no 119 dia de vida.

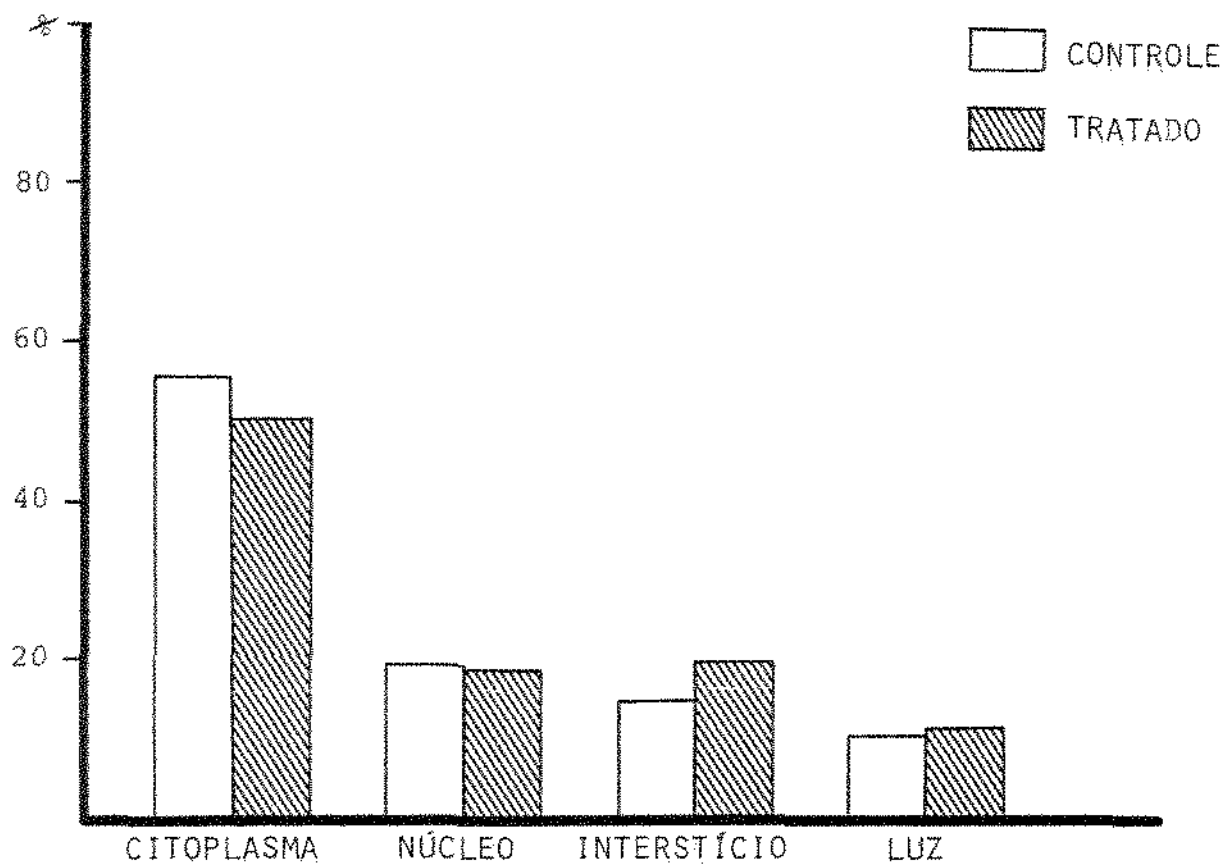


FIGURA 10 - Média dos valores correspondentes a percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados sacrificados no 16º dia de vida.

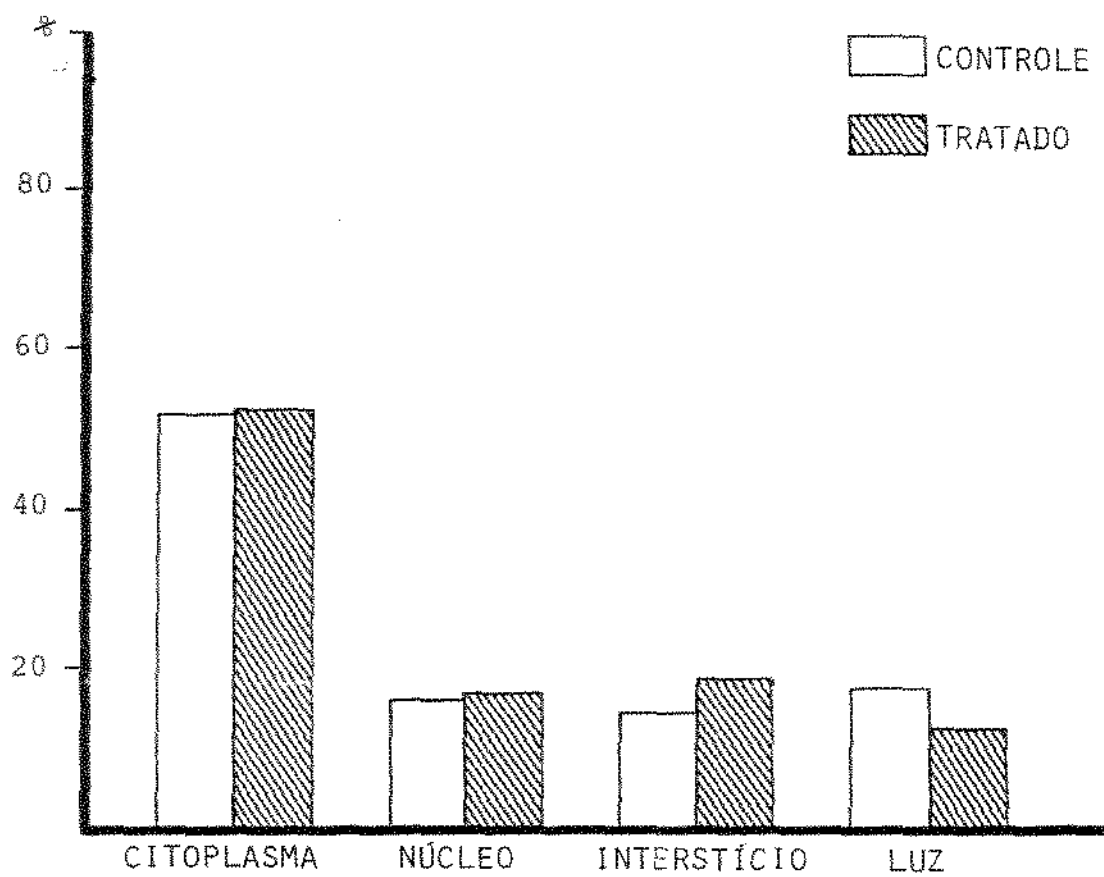


FIGURA 11 - Média dos valores correspondentes a percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados sacrificados no 21º dia de vida.

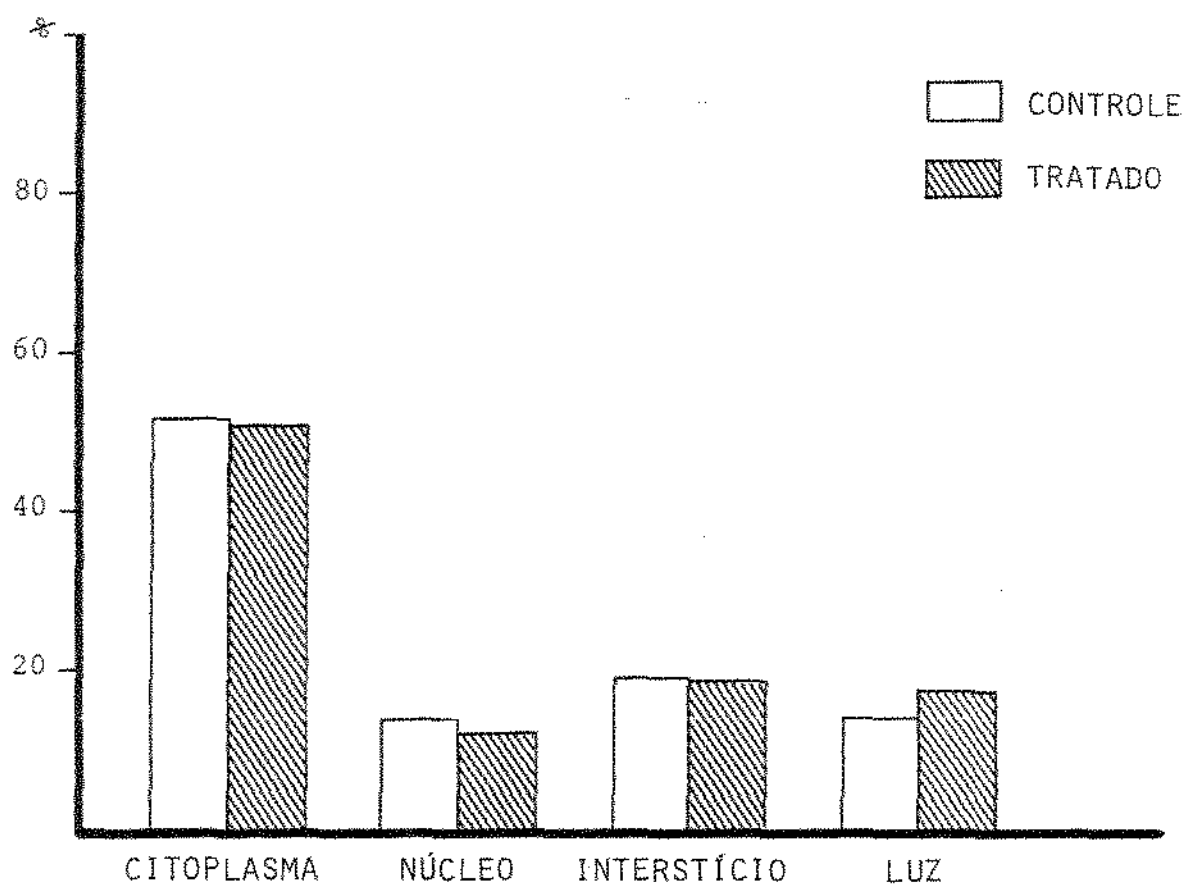


FIGURA 12 - Média dos valores correspondentes a percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas de HARDER dos ratos controles e tratados sacrificados no 26º dia de vida.

3.2.2. Resultados cariométricos

Analisando-se a Tabela 17, verificou-se que os volumes nucleares das células secretoras das glândulas de HARDER de ratos cujas mães receberam injeções de vitamina A e sacrificados no 6º dia de vida, foram menores ($76,96 \mu\text{m}^3 \pm 9,80$) do que os animais controles ($85,69 \mu\text{m}^3 \pm 6,91$). E, na Tabela 12, observou-se que a maior percentagem de volumes nucleares dos animais tratados com vitamina A, estava entre os valores 50 — 100 (68,6%) e que a dos animais controles também se situaram neste intervalo, ou seja, 50 — 100 (63,8%). Para a confirmação destes dados, foi construído, com auxílio de uma régua logarítmica, um histograma (Figura 13), onde está representada a distribuição de frequência dos volumes nucleares absolutos das células acinares das glândulas de HARDER dos animais sacrificados no 6º dia de vida pós-natal. Pela análise desta Figura, observou-se um pequeno desvio para a esquerda da mediana nos animais tratados, fato este que foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se o quadro abaixo:

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	166	218	384
Valores iguais ou maiores que a mediana	344	282	616
Total	500	500	1000

obteve-se um χ^2 de valor 10,99, que quando comparado ao χ^2 tabela do de valor 3,84, levou a rejeição da hipótese que os valores fossem iguais.

Com relação aos volumes nucleares das células acinares dos animais controles e tratados sacrificados no 119 dia de vida, foi verificado pela análise da Tabela 18, que nos animais tratados os volumes nucleares apresentaram-se com resultados exatamente opostos ao caso anterior, ou seja, maiores ($77,05 \mu\text{m}^3 \pm 6,11$) do que os dos animais controles ($70,21 \mu\text{m}^3 \pm 1,46$), sendo que tal fato foi confirmado quando se analisou a Tabela 13, onde foi encontrado também que a maior percentagem de volumes nucleares nos animais tratados e controles estava entre os valores 50 — 100 (71,8% e 74,0%, respectivamente). Esta diferença foi evidenciada pela análise da Figura 14, onde estão representadas as distribuições de frequência dos volumes nucleares nos animais controles e tratados, onde observou-se um deslocamento para a esquerda nos animais controles. Este desvio foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se o quadro abaixo:

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	265	197	462
Valores iguais ou maiores que a mediana	235	303	538
Total	500	500	1000

obteve-se um χ^2 de valor 1,80 que, quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou a rejeição da hipótese que os valores fossem iguais.

Analisando-se a Tabela 19, verificou-se que os volumes nucleares das células secretoras das glândulas de HARDER dos animais tratados e sacrificados no 169 dia de vida, foram menores ($59,23 \mu\text{m}^3 \pm 7,19$) que os dos animais

controles ($77,98 \mu\text{m}^3 \pm 3,66$). Na Tabela 14, este fato mostrou-se evidente, pois apesar da maior percentagem dos volumes nucleares dos animais tratados e controles se situarem no mesmo intervalo de classe, ou seja, 50 — 100, as suas freqüências relativas foram diferentes (69,8% para os tratados e 79,0% para os controles). A Figura 15, onde está representado o histograma de freqüência dos volumes nucleares dos animais acima mencionados, mostrou um deslocamento à esquerda da mediana dos animais tratados em relação aos controles, o qual foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se os dados constantes do quadro abaixo:

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	139	319	458
Valores iguais ou maiores que a mediana	361	181	542
Total	500	500	1000

obteve-se um χ^2 no valor de 12,90, que quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou rejeição da hipótese H_0 .

Os animais sacrificados no 219 dia de vida, cujas mães receberam dosagens diárias de vitamina A, intraperitonalmente, mostraram-se ainda com os volumes nucleares das células acinares diferentes (Tabela 20), ($70,28 \mu\text{m}^3 \pm 3,96$) quando comparado aos animais controles ($80,85 \mu\text{m}^3 \pm 5,54$). Na Tabela 15, estão registrados estes dados, com a maior percentagem dos volumes nucleares dos animais tratados e controles situados no mesmo intervalo de classe, ou seja, 50 — 100 (88,0% para os tratados e 80,2% para os controles). Analisando-se a Figura 16,

onde está representado o histograma de freqüência dos valores relativos a este último Grupo, observou-se ainda um pequeno desvio à esquerda da mediana para os tratados, o qual foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se os dados constantes no quadro abaixo, obteve-se um χ^2 de valor 5,40, que quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou a rejeição da possibilidade desses valores serem semelhantes.

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	155	271	426
Valores iguais ou maiores que a mediana	345	229	574
Total	500	500	1000

Finalmente, com relação aos volumes nucleares das células acinares dos animais controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida, foi verificado pela análise da Tabela 21, que o resultado foi semelhante ao caso anterior, ou seja, menores nos tratados ($80,63 \mu\text{m}^3 \pm 2,78$) e maiores nos controles ($92,46 \mu\text{m}^3 \pm 4,73$), tal fato foi também evidenciado quando da análise da Tabela 16, uma vez que a maior percentagem dos volumes nucleares dos animais tratados se situou no intervalo 50 — 100 (91,4%) enquanto que para os controles foi obtida uma menor freqüência no mesmo intervalo (69,0%). A pequena diferença entre os valores dos volumes nucleares destes 2 Grupos foi evidente pela análise da Figura 17, onde estão representadas as distribuições de freqüência dos volumes nucleares nos animais controles e tratados, onde observou-se um deslocamento para a esquerda da mediana dos animais tratados. Este pequeno desvio foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Quando se consi-

derou o quadro abaixo, obteve-se um χ^2 de valor 5,65 que, quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou a rejeição da hipótese que os valores fossem iguais.

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	169	268	437
Valores iguais ou maiores que a mediana	331	232	563
Total	500	500	1000

Baseado nestes resultados pode-se concluir que a administração de vitamina A em uma rata durante a lactação, parece ter provocado nas glândulas de HARDER dos filhotes, inicialmente, um menor crescimento volumétrico, quando comparado aos animais controles.

Esta situação inverteu-se nos animais sacrificados no 11º dia de vida, enfatizando uma reação nuclear à ação da vitamina A e posteriormente a glândula dos animais tratados entrou em exaustão, persistindo um menor crescimento volumétrico nuclear até ao final do experimento.

TABELA 12 - Número de núcleos das células secretoras da glândula de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 6º dia de vida.

Intervalo de classe(μm^3)		Número de núcleos controle	Frequência Relativa	Número de núcleos tratados	Frequência Relativa
0	50	53	10,6	70	14,0
50	100	319	63,8	343	68,6
100	150	116	23,2	82	16,4
150	200	11	2,2	5	1,0
200	250	1	0,2	-	-
		500	100%	500	100%

TABELA 13 - Número de núcleos das células secretoras da glândula de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 11º dia de vida.

Intervalo de classe(μm^3)		Número de núcleos controle	Frequência Relativa	Número de núcleos tratados	Frequência Relativa
0	50	89	17,8	67	13,4
50	100	370	74,0	359	71,8
100	150	40	8,0	68	13,6
150	200	1	0,2	5	1,0
200	250	-	-	1	0,2
		500	100%	500	100%

TABELA 14 - Número de núcleos das células secretoras da glândula de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 169 dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)		Número de núcleos controle	Frequência Relativa	Número de núcleos tratados	Frequência Relativa
0	50	49	9,8	144	28,8
50	100	395	79,0	349	69,8
100	150	54	10,8	6	1,2
150	200	2	0,4	1	0,2
200	250	-	-	-	-
		500	100%	500	100%

TABELA 15 - Número de núcleos das células secretoras da glândula de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 21º dia de vida.

Intervalo de classe(μm^3)		Número de núcleos controle	Frequência Relativa	Número de núcleos tratados	Frequência Relativa
0	50	27	5,4	41	8,2
50	100	401	80,2	440	88,0
100	150	72	14,4	19	3,8
150	200	-	-	-	-
200	250	-	-	-	-
		500	100%	500	100%

TABELA 16 - Número de núcleos das células secretoras da glândula de HARDER de ratos controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida.

Intervalo de classe(μm^3)		Número de núcleos controle	Frequência Relativa	Número de núcleos tratados	Frequência Relativa
0	50	8	1,6	2	0,4
50	100	345	69,0	457	91,4
100	150	139	27,8	41	8,2
150	200	7	1,4	-	-
200	250	1	0,2	-	-
		500	100%	500	100%

TABELA 17 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células glandulares em micrômetros cúbicos, dos animais controles e tratados, sacrificados no 69 dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
79,71	92,75
91,54	76,75
88,90	76,90
76,88	66,53
91,43	71,87
\bar{X} 85,69 (\pm 6,91)	\bar{X} 76,96 (\pm 9,80)

TABELA 18 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células glandulares em micrômetros cúbicos, dos animais controles e tratados, sacrificados no 11º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
72,01	76,51
69,66	71,52
69,04	72,01
71,51	78,65
68,82	86,57
\bar{X} 70,21 (\pm 1,46)	\bar{X} 77,05 (\pm 6,11)

TABELA 19 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células glandulares em micrômetros cúbicos, dos animais controles e tratados, sacrificados no 169 dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
77,54	63,17
72,54	54,93
77,81	64,72
82,67	64,72
79,34	48,63
\bar{X}	\bar{X}
77,98	59,23
(\pm 3,66)	(\pm 7,19)

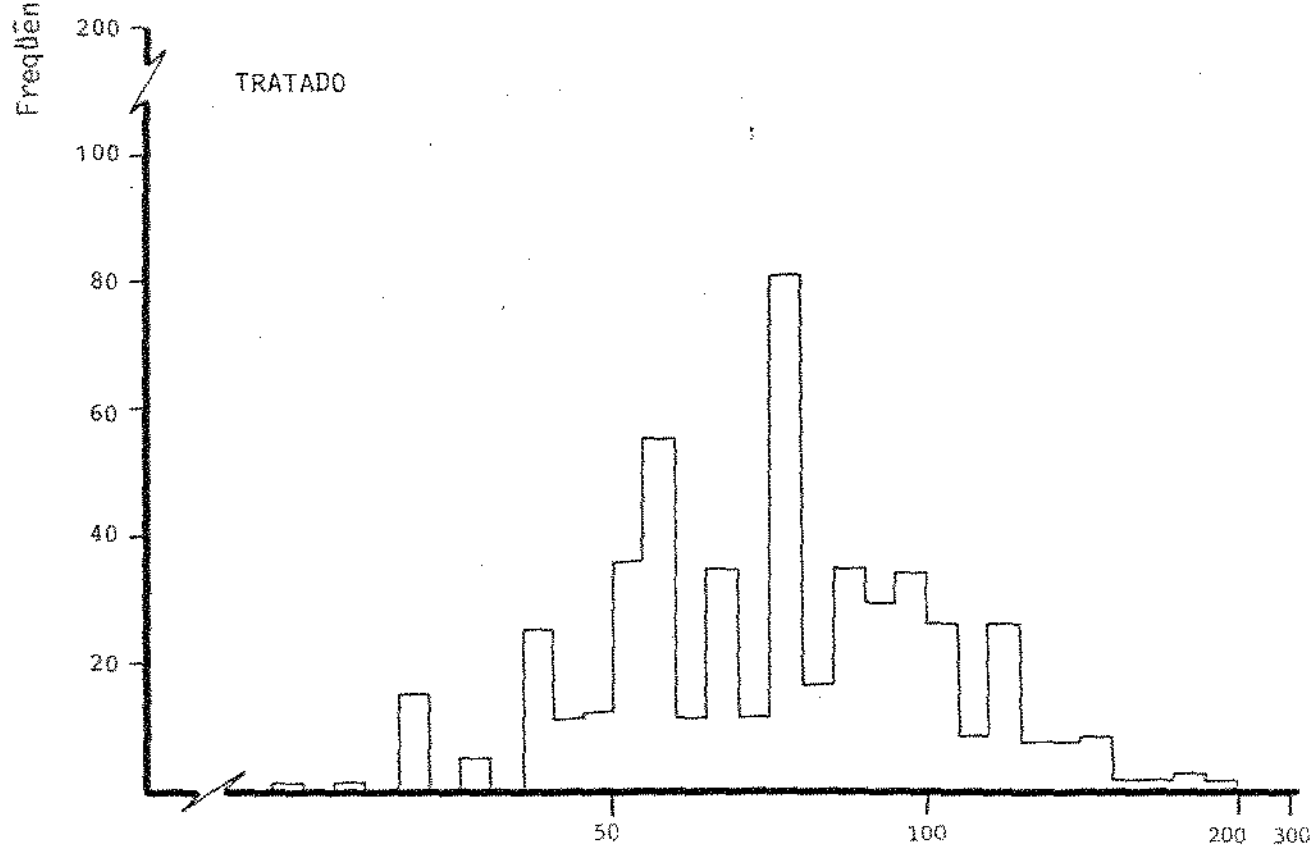
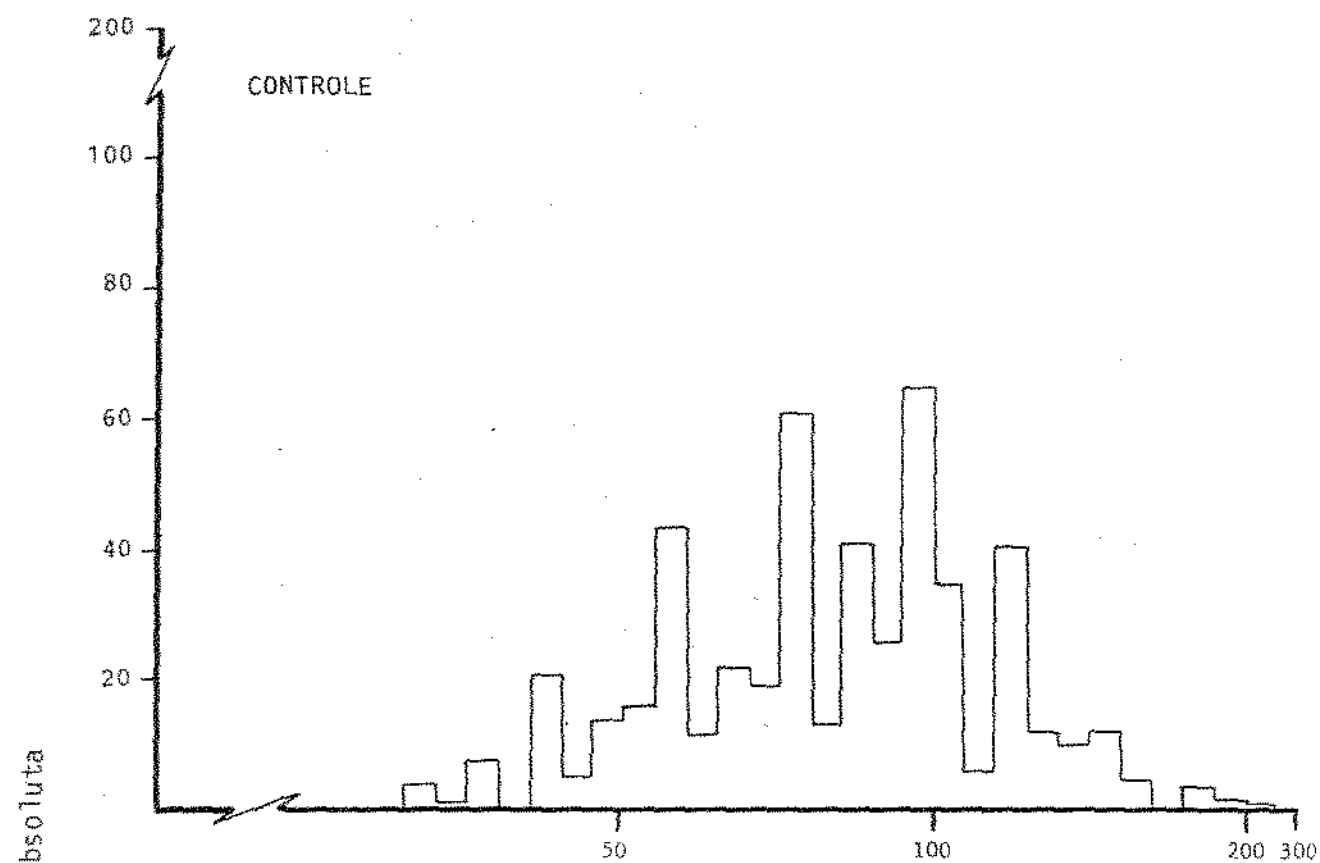
TABELA 20 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células glandulares em micrômetros cúbicos, dos animais controles e tratados, sacrificados no 21º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
73,67	67,67
76,11	72,12
84,43	72,54
84,33	74,33
85,73	64,72
\bar{X}	\bar{X}
80,85	70,28
(\pm 5,54)	(\pm 3,96)

TABELA 21 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células glandulares em micrômetros cúbicos, dos animais controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
93,25	82,44
100,16	82,83
87,86	80,89
91,21	81,11
89,82	75,89
\bar{X}	\bar{X}
92,46	80,63
(\pm 4,73)	(\pm 2,78)

FIGURA 13 - Representação gráfica da distribuição de frequência dos volumes nucleares dos ácinos das glândulas de HAR DER dos animais controles e tratados, sacrificados no 69 dia de vida.



Volume nuclear absoluto (μm^3)

FIGURA 14 - Representação gráfica da distribuição de frequência dos volumes nucleares dos ácinos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 119 dia de vida.

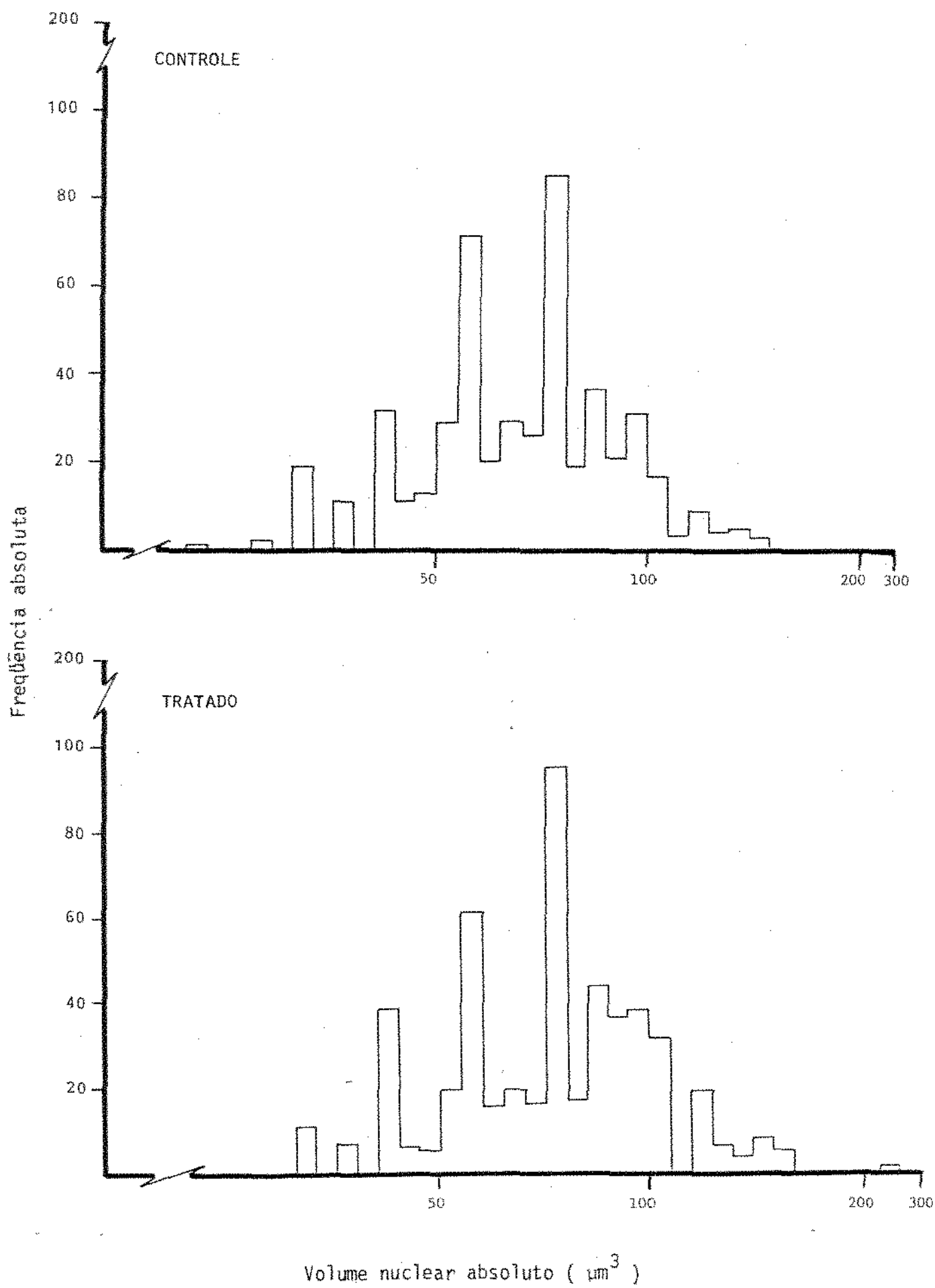


FIGURA 15 - Representação gráfica da distribuição de frequência dos volumes nucleares dos ácinos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 16º dia de vida.

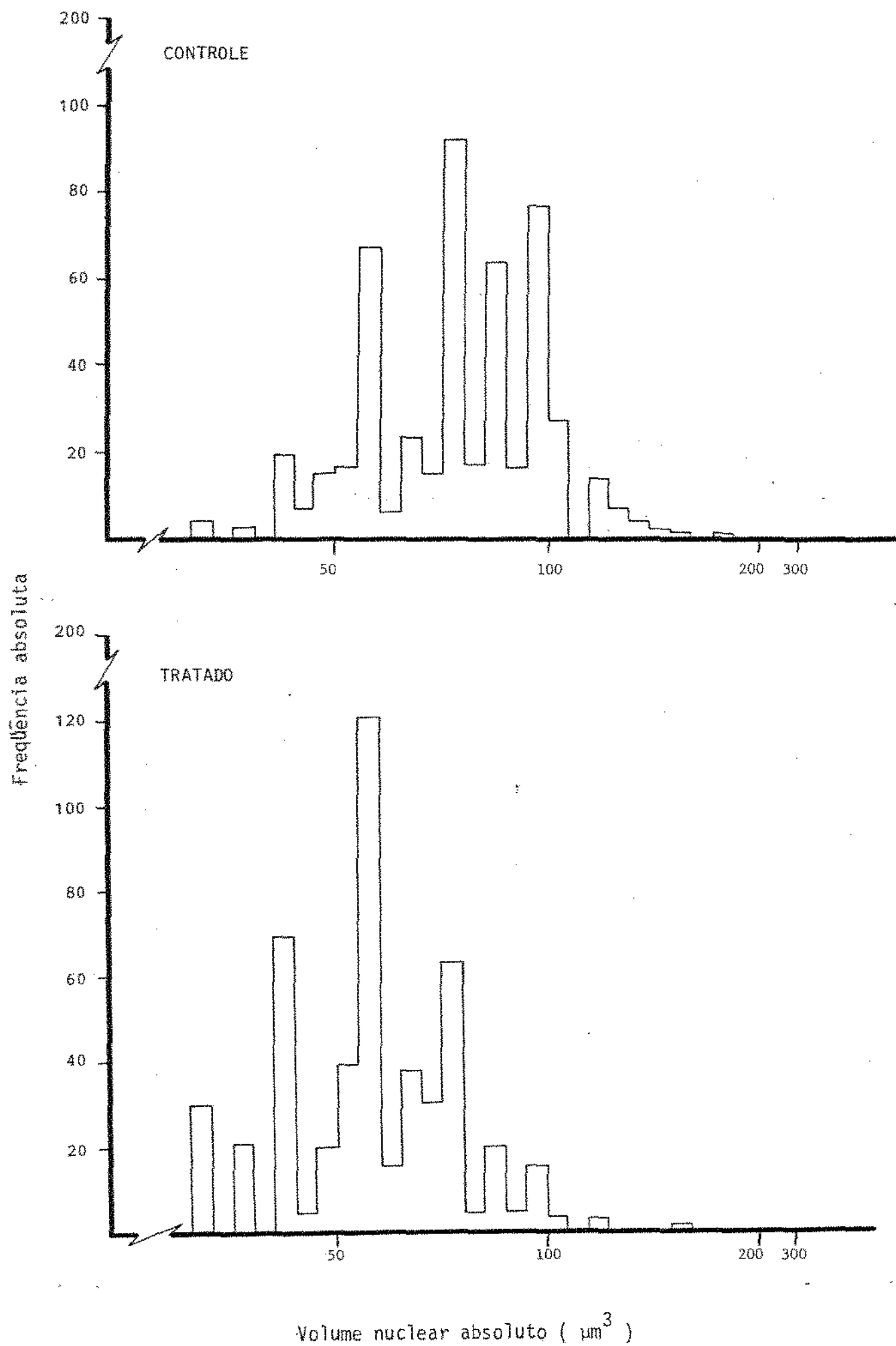


FIGURA 16 - Representação gráfica da distribuição de frequência dos volumes nucleares dos ácinos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 21º dia de vida.

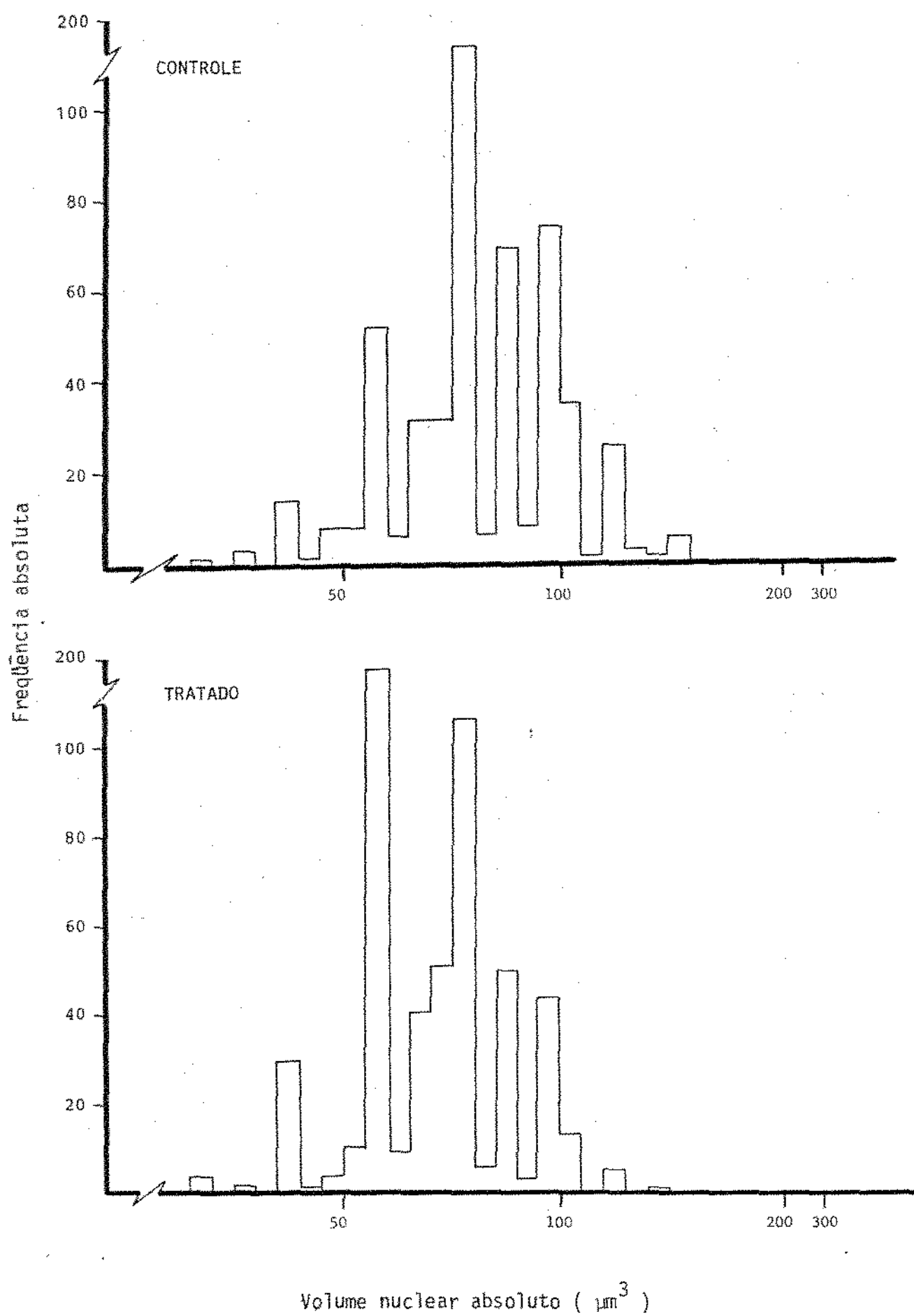
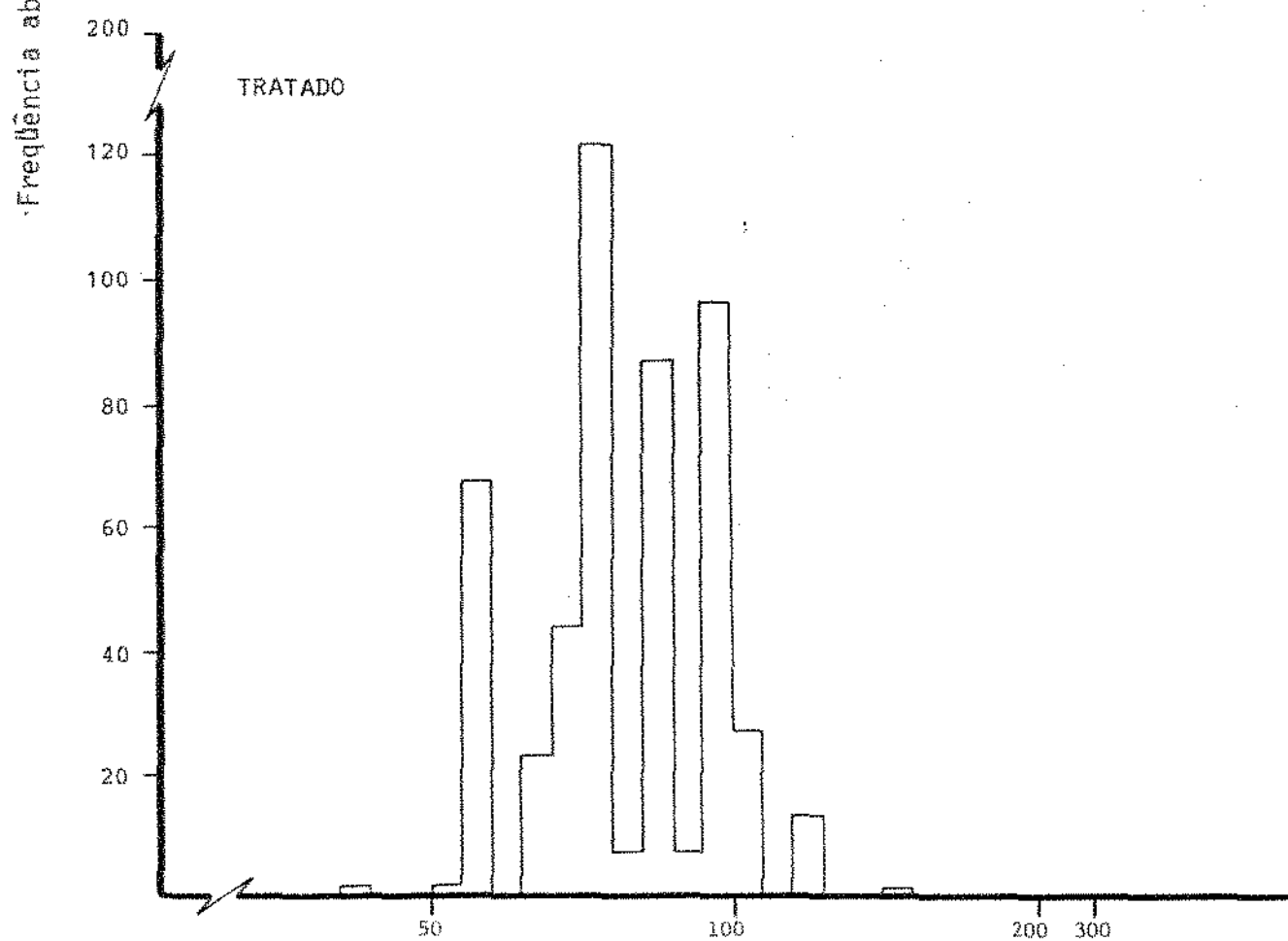
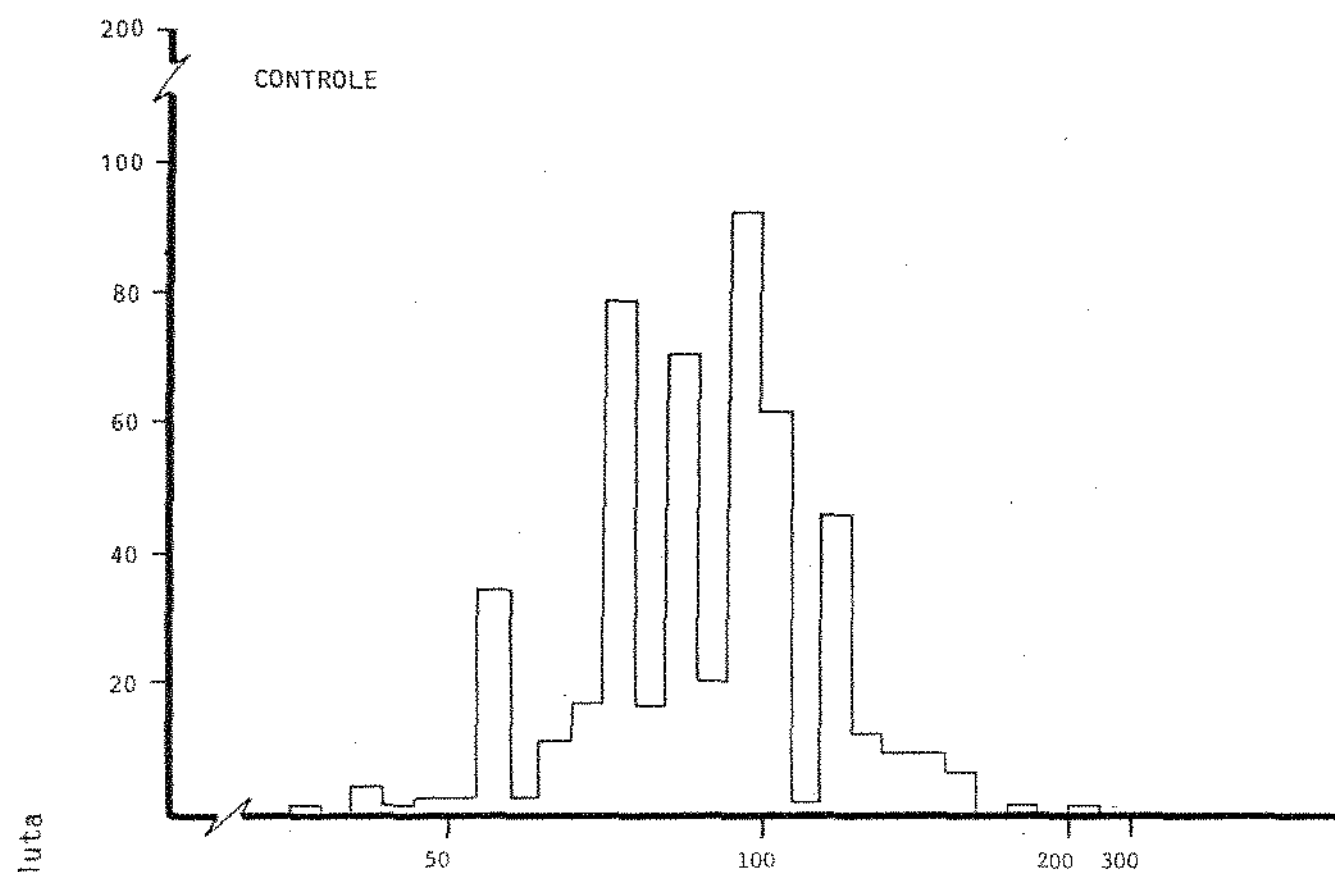


FIGURA 17 - Representação gráfica da distribuição de frequência dos volumes nucleares dos ácinos das glândulas de HARDER dos animais controles e tratados, sacrificados no 26º dia de vida.



Volume nuclear absoluto (μm^3)

4. DISCUSSÃO

Os estudos relativos à excreção da vitamina A vêm sendo feitos há algum tempo. WOLF, KAHN & JOHNSON (1957), após injetarem $14 - ^{14}C$ retinol em ratos, observaram nas amostras de fezes e urina obtidas dos animais com 24 horas de injeção, uma eliminação de 20% do ^{14}C em metabólitos de vitamina A nas fezes e uma eliminação de 12% na urina. Esses autores verificaram também, que somente após 11 dias de administração da droga marcada, o ^{14}C foi totalmente eliminado.

Utilizando acetato de $6,7 - ^{14}C$ retinil, injetado em rato, WOLF & JOHNSON (1960), mostraram que 5% dos ^{14}C foram oxidados a gás carbônico e eliminados pela respiração em um período de 48 horas. A correlação entre o estoque de vitamina A no fígado e a excreção urinária e fecal de metabólitos de vitamina A em ratos foi feita por VARMA & BEATON (1972), os quais observaram que a excreção é proporcional ao estoque de vitamina A no fígado.

Uma outra via importante de eliminação de vitamina A é o leite. BRANSTETTER e cols. (1973), demons -

traram em vários animais, incluindo a vaca e o rato, que de 50% a 60% da vitamina A ingerida e armazenada no corpo da mãe passa para o filho através do leite.

Em ratos jovens e adultos, as consequências de doses elevadas de vitamina A, observadas ao exame geral, são: falta de apetite, fraqueza muscular, perda de pêlos, edema de pálpebra, incrustações de pigmentos de porfirina ao redor dos olhos, catarata, colamento das pálpebras, cegueira, alterações ósseas, paralisia das pernas traseiras, perda de peso e eventualmente, morte. Essas observações foram descritas inicialmente em trabalhos de MOORE (1957, 1965), o qual utilizou a via intraperitoneal como via de administração de vitamina A.

Em nosso material, quando da utilização do leite materno como via de administração de vitamina A, nenhuma alteração acima citada foi encontrada, inclusive o desenvolvimento corporal dos animais controles e tratados foi bastante semelhante (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).

Já o peso das glândulas de HARDER não acompanhou o peso corporal dos animais, pois, apesar de ocorrer desenvolvimento semelhante entre os animais controles e tratados, a média dos pesos das glândulas foi maior nos ratos tratados quando comparada aos controles, em todos os períodos estudados (Tabela 1). Este fato sugere um desenvolvimento precoce das glândulas de HARDER dos animais tratados provocado pela vitamina A.

Histologicamente, as glândulas de HARDER dos animais cujas mães receberam vitamina A durante os primeiros 10 dias de lactação, apresentaram diferenças estruturais representadas por um aumento do tecido conjuntivo intersticial em todos os períodos estudados, citoplasma de células secretoras com menor altura nos ratos tratados nos primeiros períodos experimentais, e nos animais mais velhos, a eosinofilia dos citoplasmas destes animais tratados foi bastante marcante (Figuras 6D e F, 7D e F e 6F e 7F). É importante ressaltar, que a quantidade de produ

tos de secreção, bem como a presença de células em degeneração na luz dos ácinos, foi maior nos ratos tratados. Este fato sugere que a vitamina A teria provocado uma proliferação de fibras colágenas no interstício das glândulas destes animais e também uma evolução precoce da glândula, iniciando nos animais tratados, o ciclo secretório mais cedo. Daí, o aumento da luz acinar evidenciado precocemente na glândula destes animais.

Uma das funções mais importantes da vitamina A é a manutenção da integridade morfológica e funcional das células epiteliais, quer de revestimento quer glandulares. Há, pois, a necessidade de uma quantidade balanceada de vitamina A na dieta, para que ocorra alterações nestes epitélios. As alterações epiteliais ocasionadas pela vitamina A são bem conhecidas. Estudos recentes mostraram que o excesso de vitamina A ocasiona nos epitélios, metaplasia mucosa, aumento da espessura da camada basal com hipertrofia e hiperplasia, além de aumento na atividade mitótica. Essas alterações são devidas à ação direta da vitamina A e foram verificadas, em estudos "in vitro" e "in situ", na epiderme e nos epitélios, esofágicos, bucal e lingual do rato, camundongo e hamster (SABELLA, BERN & KAHN, 1951; FELL & MELLANBY, 1950, 1953; WEISS & JAMES, 1955; BERN & cols., 1955; LAWRENCE & BERN, 1958, 1960, 1963; LAWRENCE & cols., 1960; AYDELOTTE, 1963; NEW, 1963; HARDY, 1968).

Também são bem conhecidos os efeitos destes desníveis de vitamina A nos epitélios glandulares. Os efeitos da vitamina A têm sido estudados na glândula de HARDER do rato (COSTA & cols., 1978, 1979), nas glândulas sebáceas (LOPES & cols., 1978) e nas glândulas salivares (REGESI & ROWE, 1972; LOPES & cols., 1973; LOPES & cols., 1974; PETENUSCI & cols., 1976; BUONAROTTI & cols., 1977; LOPES & cols., 1978; LOPES & cols., 1979; LOPES & cols., 1980; LOPES & cols., 1981).

REGESI & ROWE (1972) observaram, na glândula submandibular do rato, ao nível de microscopia eletrônica, hipertrofia e hiperplasia do retículo endoplasmático rugoso

e do aparelho de Golgi, quando o animal era submetido à hipervitaminose A. Além disso, mostraram a formação prematura de grânulos de secreção e a luz dos ácinos achava-se dilatada. Tais evidências indicam glândulas em atividade secretora aumentada. À medida que a hipervitaminose torna-se cada vez mais aguda, iniciam-se os sinais de degeneração celular. Tal fato foi observado na glândula sublingual do rato por LOPES & cols. (1974) e por COSTA & cols. (1978). A diminuição no tamanho das células acinares e número aumentado de células em degeneração na luz acinar, além da presença de núcleos menores que os normais, indicam também um quadro de glândula que foi hiperativa, que está entrando em exaustão (COSTA & cols., 1978). A presença de células em degeneração, numa glândula hiperativa, pode sugerir morte celular prematura por excesso de síntese e posterior exaustão e é seguida por uma hiperplasia fibrosa.

Os nossos resultados morfométricos confirmaram os achados histológicos, uma vez que os resultados obtidos com a técnica de CHALKLEY (1943) revelaram que a vitamina A provocou um aumento do tecido intersticial e da luz acinar, e, uma diminuição do citoplasma das células secretoras das glândulas de HARDER, quando comparados aos resultados dos animais controles (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 e Figuras 8, 9, 10, 11 e 12).

Os núcleos das células secretoras foram avaliados morfometricamente com o emprego da cariometria, quando se observou que os volumes nucleares nos ratos tratados eram pouco menores que os dos controles, na maioria dos períodos experimentais (Tabelas 17, 18, 19, 20 e 21 e Figuras 13, 14, 15, 16 e 17).

Uma explicação razoável, que esclarece o fenômeno da diminuição percentual do citoplasma das fibras obtido pela técnica de CHALKLEY (1943), bem como da posterior degeneração e morte celular prematura por excesso de síntese e exaustão, seguida, conseqüentemente, de uma fibrose, poderia ser considerada como resultante da ação direta da vitamina A nas mem-

branas das células acinares. Existem evidências de que a vitamina A em excesso causa um aumento da permeabilidade das membranas das células, incluindo as organelas (FELL & cols., 1962). O aumento da permeabilidade da membrana lisossomal promove o seu rompimento liberando enzimas digestivas hidrolíticas aí contidas, as quais destruiriam as células (GLICK & KERR, 1968). Segundo APPELMANS & DE DUVE (1961) e DINGLE (1961) a liberação das enzimas lisossomais dependem em muito da concentração de vitamina A.

Sabe-se que a vitamina A é mobilizada no fígado e levada aos tecidos por meio de transporte altamente regulado. Este sistema envolve duas proteínas plasmáticas: a proteína ligada ao retinol RBP e a pré-albumina. A vitamina A circula no plasma na forma de retinol especialmente ligada ao RBP, que por outro lado forma um complexo proteína-proteína com a albumina. Estas proteínas servem então para transportar a vitamina A do fígado para as membranas.

Os casos de alterações teciduais por ação da vitamina A parecem ocorrer "in vivo", somente quando o nível de vitamina A é tal que o retinol começa a circular no plasma e atingir as membranas numa outra forma que aquela ligada ao RBP. MALLIA & cols. (1975) estudando ratos submetidos a doses excessivas de vitamina A, verificaram que o nível de RBP estava reduzido significativamente e que a maior parte da vitamina A circulava no plasma como éster do retinol, associado a lipoproteína de pequena densidade. Desta maneira, a liberação desregulada e não específica de vitamina A até os tecidos, levaria à toxicidade. Tais fatos receberam apoio no estudo sobre o transporte de vitamina A em humanos, realizado por SMITH & GOODMAN (1976).

Uma outra atuação da vitamina A sobre as células glandulares seria a de maneira indireta, mediada pela adrenal, pois sabe-se que a vitamina A atua diretamente na função desta glândula (SELYE, 1958). Além disso, há uma relação entre a permeabilidade da membrana e os hormônios da glândula. A vitamina A introduzida no organismo provocaria então um aumento da permea-

bilidade da membrana da célula e das organelas (DINGLE & LUCY, 1965) e exerceria sua ação nos tecidos da glândula adrenal (MATHUR & cols., 1973; MISRA & SRIVASTAVA, 1974). Tendo em vista que a vitamina A afeta a estabilidade estrutural dos lisossomos (DINGLE, 1961; FELL & DINGLE, 1963; ROELS & cols., 1969) e que os corticosteróides por outro lado protegem os lisossomos de desintegração (FELL & THOMAS, 1961) e que a vitamina A provoca hipertrofia e hiperfunção da adrenal mediada pela hipófise. RAM & MISRA (1975), admitiram que nos casos de estimulação máxima da adrenal pela vitamina A, a síntese e liberação de corticosteróides também deveriam ser máximas, vindo assim proteger as membranas dos lisossomos da ação direta da vitamina A. Entretanto, a estimulação pela vitamina A, quer pela administração prolongada no rato adulto, quer pela administração de doses excessivas através do leite no rato em lactação, provoca uma diminuição nos níveis de colesterol e de ácido ascórbico na glândula adrenal, e sabe-se que o ácido ascórbico inibe a ruptura da cadeia lateral do colesterol, influenciando, conseqüentemente, a gênese dos esteróides. Quando essa hiperatividade da adrenal não fosse proporcional às concentrações séricas de vitamina A, haveria diminuição na síntese e na liberação de adrenocorticoide, resultando na desintegração dos lisossomos e desencadeando, portanto, processo degenerativo nas células acinares das glândulas de HARDER dos animais utilizados.

Uma complementação para a explicação das alterações morfológicas observadas nas glândulas de HARDER dos ratos tratados poderia basear-se na correlação entre as alterações das membranas celulares e das organelas (controladas pela adrenal) com outros hormônios que interferem na estrutura e funcionamento desta glândula. Assim, sabendo-se que esta glândula para manter sua integridade histológica e funcional necessita, segundo BOAS & BATES (1954), da ação sinérgica da tireoxina e um fator da hipófise (possivelmente o hormônio do crescimento), qualquer alteração na produção ou no transporte da tireoxina no organismo, poderia ser responsável por modificações nesta glândula. SADHU

& TRUSCOTT (1948) já haviam verificado que o excesso de vitamina A reduzia a secreção de tireoxina e o fato de que o retinol e a tireoxina são transportados no plasma por um mesmo complexo proteico, levou PETERSON & cols. (1973) a sugerirem que estas substâncias competiriam entre si pelo mesmo transportador. Isto nos leva a sugerir que de uma maneira ou de outra a glândula seria lesada.

5. CONCLUSÕES

As glândulas de HARDER de ratos em lactação, cujas mães receberam 20.000 UI de vitamina A durante 10 dias consecutivos e dos seus controles, foram estudadas histológica e morfometricamente, o que possibilitou ao autor as seguintes conclusões:

- 1) O peso corporal dos animais tratados, cujas mães receberam doses excessivas de vitamina A, apresentou um crescimento semelhante aos animais controles durante todo o experimento, em todos os Grupos.
- 2) A hipervitaminose provocou um aumento do peso glandular nos animais tratados quando comparado aos controles, durante todo o experimento.
- 3) A análise histológica demonstrou que nas glândulas de HARDER dos animais tratados ocorreu um desenvolvimento mais precoce da glândula, bem como aumento do tecido conjuntivo intersticial,

citoplasma com menor altura e maior eosinofilia

- 4) Os achados histológicos foram confirmados, na sua maior parte, pela aplicação da técnica de CHALKLEY (1943). Assim, para a glândula de HARDER, foi possível observar no animal hipervitaminótico A, diminuição do volume relativo do citoplasma na fase inicial do experimento, voltando ao normal na fase final. Fenômeno contrário ocorreu com relação à luz acinar, que aumentou no início do experimento tornando-se semelhante ao controle na fase final. Com relação aos componentes do tecido intersticial foi possível observar-se um aumento progressivo destes até o 21º dia, voltando a assemelhar-se aos controles no 26º dia de vida.
- 5) A cariometria permitiu concluir que no início do experimento ocorreu uma diminuição volumétrica nuclear nas glândulas dos animais tratados em relação aos controles, ocorrendo, entretanto, uma inversão no Grupo de animais sacrificados no 11º dia de vida, para posteriormente, ocorrer uma nova diminuição volumétrica nuclear até o final do experimento.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, S.R.; SWANSON, W.J.; RISLEY, H.A. & HARRIS, P.L. Vitamin A aldehydes metabolism, biopotency an toxicity. Fed. Proc., 13: 174, 1954.
- APPELMANS, F. & DE DUVE, C. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat liver particles. Biochem. J., 59: 426, 1955.
- AYDELOTTE, M.B. The effects of vitamin A and citral on epithelial differentiation in vitro. 1. The chick tracheal epithelium. J. Embryol. Exp. Morph., 11: 279, 1963.
- BERN, H.A.; ELIAS, J.J.; PICKETT, P.B.; POWAR, T.R. & HARKNESS, M.N. The influence of vitamin A on the epidermis. Amer. J. Anat., 96: 419-441, 1955.
- BOAS, N.F. & BATES, R.W. Role of the thyroid and anterior pituitary glands in the maintenance of the harderian glands of the rat. Endocrinology, 55: 601, 1954.
- BRANSTETTER, R.F.; TUCKER, R.E.; MICHELL JUNIOR, J.E.; BOLING, J. A. & BRADLEY, N.W. Vitamin A transfer from cows to calves.

- Internat. J. Vit. Nutr. Res., 43: 142-146, 1973.
- BUONAROTT, I.; BIRMAN, E.G.; LOPES, R.A. & AZOUBEL, R. Estudo morfológico de glândulas salivares, esôfago, duodeno e intestino grosso de ratos submetidos à hipervitaminose A crônica. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 14: 73-79, 1977.
- CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J. Nat. Cancer Inst., 4: 47, 1943.
- COLLAZO, J.A. & RODRIGUES, J.S. Hypervitaminosis A. Klin Wschr., 12: 1732-1734, 1933.
- COSTA, J.R.V.; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Effect of hypervitaminosis A on the harderian gland in rats. A morphologic and morphometric study. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 48: 113-122, 1978.
- COSTA, J.R.V.; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Efeitos da hipervitaminose A na glândula lacrimal extra-orbitária do rato. Estudo morfológico e morfométrico. Cien. cult., 31: 189-196, 1979.
- COSTA, J.R.V.; IUCIF, S.; PAULA-LOPES, O.V. & LOPES, R.A. Estudo da reversibilidade de lesões no músculo cardíaco de ratos submetidos à hipervitaminose A. Rev. Fac. Odont. Ribeirão Preto, 20: 78-93, 1983.
- DANIEL, M.R.; DINGLE, J.T.; GLAUERT, A.M. & LUCY, J.A. The action of excess vitamin A alcohol on the fine structure of rat dermal fibroblasts. J. Cell. Biol., 30: 465, 1966.
- DAVIES, A.W. & MOORE, T. Vitamin A and carotene. XI The distribution of vitamin A in the organs of the normal and hypervitaminotic rat. Biochem. J., 28: 288-295, 1934.
- DINGLE, J.T. Release of a bound protease by the action of vitamin A. Biochem. J., 79: 509, 1961.
- DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. V. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem. J., 98: 173, 1962.

- DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Membrane phenomenon in relation to vitamin A. Proc. Nutr. Soc., 24: 170, 1965.
- DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. & FELL, H.B. Effect of excess of vitamin A on the metabolism and composition of embryonic chick-limb cartilage grown in organ culture. Biochem. J., 79: 497, 1961.
- FELL, H.B. & DINGLE, J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. I. Lysosomal protease and degradation of cartilage matrix. Biochem. J. 87: 403-408, 1963.
- FELL, H.B.; DINGLE, J.T. & WEBB, M. The specificity on the effect on embryonic chick-limb cartilage in culture and on isolated rat liver lysosomes. Biochem. J., 83: 63-69, 1962.
- FELL, H.B. & MELLANBY, E. Effects of hypervitaminosis A on foetal mouse bones cultivated in vitro. Brit. Med. J., 2: 535-539, 1950.
- FELL, H.B. & MELLANBY, E. Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. J. Physiol., 119: 470-488, 1953.
- FELL, H.B. & THOMAS, L. Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage. II. The effects on organ cultures of embryonic skeletal tissue. J. Exper. Med., 111: 719-744, 1960.
- FELL, H.B. & THOMAS, L. The influence of hydrocortisone on the action of excess vitamin A on limb-bone rudiments in culture. J. Exper. Med., 114: 343-462, 1961.
- FRANQUIN, J.C.; KORNER, W.F.; WEISER, H. & BAUME, L. L'épithélium gingival du rat blanc soumis à une carence à vitamine A et à une hypervitaminose A. Schweiz. Mschr. Zahnheilk., 19: 926, 1969.
- GANGULY, J. Metabolism of vitamin A. J. Sci. Ind. Res., 26: 110-130, 1967.
- GLAUERT, A.M.; DANIEL, M.R.; LUCY, J.A. & DINGLE, J.T. Changes in the fine structure of erythrocyte during haemolysis by vitamin A. J. Cell. Biol., 17: 111-121, 1963.

- GLICK, D. & KERR, W.J. Effect of vitamin A "in vitro" on histamine release and structure of mast cells. Exper. Cell. Res., 53: 129-134, 1968.
- GRAFFLIN, A.L. Histological observations upon the porphrin: excreting harderian gland of the albino rat. Amer. J. Anat., 71:43, 1942.
- HARDY, M.H. Glandular metaplasia of hair follicles and other responses to vitamin A excess in cultures of rodent-skin. J. Embryol. Exptl. Morph., 19: 157, 1968.
- JANOFF, A. & McCLUSKEY, R.T. Effect of excess vitamin A on acid-phosphatase content of guinea-pig peritoneal leucocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 110: 586-589, 1962.
- KAHN, R.H. Effect of locally applied vitamin A and estrogen on the rat vagina. Am. J. Anat., 95: 309-328, 1954.
- LAMANO CARVALHO, T.L. Estudo da reversibilidade das lesões testiculares de ratos adultos submetidos à hipervitaminose A. Ribeirão Preto, 1977. Dissertação de Mestrado, Rib. Preto - USP.
- LAWRENCE, D.J. & BERN, H.A. On the specificity on the response of mouse epidermis to vitamin A. J. Invest. Derm., 31: 313 - 325, 1958.
- LAWRENCE, D.J. & BERN, H.A. Mucous metaplasia and mucous gland formation in keratinized adult epithelium in situ treated with vitamin A. Exp. Cell. Res., 21: 443-446, 1960.
- LAWRENCE, D.J. & BERN, H.A. Vitamin A and mucous metaplasia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 106: 646-653, 1963.
- LAWRENCE, D.J.; BERN, H.A. & STEDMAN, M.G. Vitamin A and keratinization. Ann. Otol., 69: 645, 1960.
- LOPES, R.A.; AZOUBEL, R.; VALERI, V.; IUCIF, S. & GOSUEN, L.C. Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat sublingual glands. J. Dent. Res., 53: 757, 1974.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico dos efeitos da hipervitaminose

- A na glândula salival lingual posterior (de von EBNER) do rato. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 15: 79-86, 1978.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico da reversibilidade das alterações da glândula submandibular do rato submetido à hipervitaminose A. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 16: 97-109, 1979.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G.; PETENUSCI, S.O. & PICCOLO, A.M. Morphometric study of the effects of hypervitaminosis A on the sublingual gland of the rat. Arch. Latinoamer. Nutr., 30: 210-222, 1980.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; PICCOLO, A.M.; MAIA CAMPOS, G. & PETENUSCI, S.O. Study of the effect of hypervitaminosis A on the rat parotid gland. Ann. Nutr. Alim., 33: 607-618, 1979.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; PICCOLO, A.M.; MAIA CAMPOS, G. & PETENUSCI, S.O. Estudo da reversibilidade das alterações presentes da glândula de WEBER do rato submetido à hipervitaminose A. Rev. Esc. Farm. Odont. Alfenas, 3: 7-16, 1980.
- LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M.; COSTA, J.R.V. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico da reversibilidade das alterações da glândula sublingual de ratos submetidos à hipervitaminose A. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 18: 11 - 20, 1981.
- LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G.; VALERI, V. ; AZOUBEL, R. & IUCIF, S. Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat kidney, during lactation. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 9: 95-100, 1972.
- LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G.; VALERI, V.; IUCIF, S. & AZOUBEL, R. Morphologic effects of hypervitaminosis A on posterior lingual salivary glands of the rat. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 10: 23-30, 1973.
- LOPES, R.A.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J.R.V.; PICCOLO, A.M. &

- MAIA CAMPOS, G. Estudo morfométrico da reversibilidade das alterações das glândulas palatinas de ratos submetidos à hipervitaminose A. MEMÓRIA, 2: 31-38, 1982.
- LOPES, R.A.; PICCOLO, A.M.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico dos efeitos da hipervitaminose A na glândula submandibular do rato. Cien. cult., 32: 926-931, 1980.
- LOPES, R.A.; PICCOLO, A.M.; MAIA CAMPOS, G.; COSTA, J.R.V. & PETENUSCI, S.O. Efeitos da hipervitaminose A nas glândulas sebáceas do rato. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 15: 99-104, 1978.
- LOPES, R.A.; PICCOLO, A.M.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J.R.V. & MAIA CAMPOS, A.M. Effect of hypervitaminosis A on tongue muscles of the rat. A morphometric study. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 49: 235-239, 1979.
- LOPES, R.A.; VALERI, V.; IUCIF, S.; AZOUBEL, R. & MAIA CAMPOS, G. Effect of hypervitaminosis A on the testes of the rat during lactation. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 159-166, 1974.
- LUCY, J.A.; DINGLE, J.T. & FELL, H.B. A possible role of intracellular proteases in the gradation of cartilage matrix. Biochem. J., 79: 500, 1961.
- LUCY, J.A.; LUSCOMBE, M. & DINGLE, J. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. VIII. Mitochondrial swelling. Biochem. J., 89: 419, 1963.
- MADDOCK, C.L.; COHNE, J. & WOLBACH, S.B. Effect of hypervitaminosis A on the testes of the rat. Arch. Path., 56: 333-340, 1953.
- MALLIA, A.K.; SMITH, J.E. & GOODMAN, D.S. Metabolism of retinol binding protein and vitamin A during hypervitaminosis A in the rat. J. Lipid. Res., 16: 180, 1975.
- MATHUR, A.R.; RAMANATHAN, R. & MISRA, V.K. Effects of feeding excess of vitamin A and vitamin C on liver, plasma and adrenal lipids of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 19-25, 1973.

- MISRA, V.K. & SRIVASTAVA, N. Stimulation of cholesterologenesis by ascorbic acid in adrenal of rats fed vitamin A. Internat J. Vit. Nutr. Res., 44: 230-233, 1974.
- MODIS, L.; SPREGA, A.; SÜVEGES-MODIS, J. & CONTI, G. Recherches histochimiques et biochimiques sur des rats en hyper-et hypovitaminose A. Acta anat., 83: 481-504, 1972.
- MOORE, T. Vitamin A. Amsterdam, Elsevier, 1957.
- MOORE, T. Vitamin A and Proteins. Vitamin & Horm., 18: 431 - 437, 1964.
- MOORE, T. Vitamin A deficiency and excess. Proc. Nutr. Soc., 24: 129-135, 1965.
- MOORE, T. & WANG, Y.L. Hypervitaminosis A. Biochem. J., 39: 222-228, 1945.
- MORRIS, G.M. & STEELE, G.E. The effect of excess vitamin A on the development of rat embryos in culture. J. Embryol. Exp. Morphol., 32: 505, 1974.
- NEW, D.A. Effects of excess vitamin A on cultures of skin and buccal epithelium of embryonic rat and mouse. Brit. J. Derm., 75: 320, 1963.
- PETENUSCI, S.O.; LOPES, R.A.; SILVA NETTO, C.R. & MAIA CAMPOS, G. Contribuição ao estudo dos efeitos da hipervitaminose A nas glândulas salivares e adrenal do rato. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 13: 35-40, 1976.
- PETERSON, P.A.; RASK, L.; ØSTBERG, L.; ANDERSON, L.; KAMWENDO, F. & PERTOFT, A. Studies on the transport and cellular distribution of vitamin A in normal and A- deficient rats with special reference to the vitamin A- binding plasma protein. J. Biol. Chem., 248: 4009-4022, 1973.
- PICCOLO, A.M.; LOPES, R.A. & PETENUSCI, S.O. Efeitos da hipervitaminose A nas glândulas salivares do cobaio. Biológica Ribeirão Preto, 3: 7-11, 1977.

- RAM, G.C. & MISRA, V.K. Effects of vitamin A and phenobarbital on liver endoplasmatic reticulum of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 391, 1974.
- RAM, G.C. & MISRA, V.K. Studies on mode of action of vitamin A. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 45: 3-19, 1975.
- REGESI, J.A. & ROWE, N.H. Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat submandibular gland. Archs. Oral. Biol., 17: 1609-1618, 1972.
- RODAHL, K. Hypervitaminosis A in rat. J. Nutr., 41: 399, 1950.
- RODAHL, K. & MOORE, T. The vitamin A content and toxicity of bear and seal liver. Biochem. J., 37: 166-168, 1943.
- ROELS, O.A.; ANDERSON, O.R.; LUI, N.S.T.; SHAN, D.O. & TROUT, M.E. Vitamin A and membranes. Amer. J. Clin. Nutr., 22: 1020, 1969.
- ROSA, R.; GRIECO, M.L. & NICOLAU, J. The effect of hypervitaminosis A on the sialic acid and hexosamina contents of the salivary gland of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 46: 369 - 372, 1976.
- SABELLA, J.D.; BERN, H.A. & KHAN, P.H. Effect on locally applied vitamin A and strogen on rat epidermis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76: 499, 1951.
- SADHU, D.P. & TRUSCOTT, B.L. Hypervitaminosis A and the distributions of body iodine. Endocrinology, 43: 120, 1948.
- SELYE, H. Sensitization of the skeleton to vitamin A overdosage by cortisol. Arthritis Rheum., 1: 87, 1958.
- SIEGEL, S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Science, N. York, Mc Graw-Hill, 1956.
- SMITH, F.R. & GOODMAN, D.S. Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. N. Engl. J. Med., 294: 805, 1976.
- TAKEKOSHI, S. The mechanism of vitamin A induced teratogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol., 12: 263, 1964.

- THOMAS, L.; McCLUSKEY, R.T.; PORTTER, J.L. & WEISSMANN, G. Comparison of the effect of papain and vitamin A on cartilage. I. The effects in rabbits. J. Exp. Med., 111: 705, 1960.
- VALERI, V.; CRUZ, A.R.; BRANDÃO, J.S.H. & LISON, L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium, of carcinoma "in situ" and of invasive carcinoma of the uterine cervix. Acta Cytol., 11: 488, 1967.
- VARMA, R.N. & BEATON, G.H. Quantitative aspects of the urinary and fecal excretion of radioactive metabolites of vitamin A in the rat. Can. J. Physiol. Pharm., 50: 1026-1037, 1972.
- WEISS, P. & JAMES, R. Skin metaplasia "in vitro" induced by brief exposure to vitamin A. Exp. Cell. Res., 3 (suppl.):381, 1955.
- WEISSMANN, G.; UHR, J.W. & THOMAS, L. Acute hypervitaminosis A in guinea-pigs. 1. Effects on acid hydrolases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112: 284, 1963.
- WEST, E.S.; TODD, W.R.; MASON, H.S. & VAN BRUGGEN, J.T. Bioquímica médica. Interamericana, 4a. edição, 1969.
- WOLF, G. & JOHNSON, B.C. Metabolic transformation of vitamin A. Vitam. Horm., 18: 403-415, 1960.
- WOLF, G.; KHAN, S.G. & JOHNSON, B.C. Metabolism studies of radioactive vitamin A. J. Am. Chem. Soc., 79: 1208-1212, 1967.